



**EFFECTO DEL ALQUIL-AMINA-POLIETOXILADA (POEA) Y CaCO_3 EN
Piaractus brachypomus (Cuvier, 1818) (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)**

ANNYI LIZETH VARGAS PULIDO

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

**EFFECTO DEL ALQUIL-AMINA-POLIETOXILADA (POEA) Y CaCO_3 EN
Piaractus brachypomus (Cuvier, 1818) (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)**

ANNYI LIZETH VARGAS PULIDO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo
(a)

Director: M.Sc. Veterinario Pedro René Eslava Mocha
Codirectora: Ph.D. Veterinaria Yohana María Velasco Santamaría

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis abuelos, Ana Dolores Cortés Fajardo y a Jose del Carmen Pulido Neira quienes han sido mi ejemplo e inspiración, son personas humildes y trabajadoras que construyeron un hogar a través del amor y el respeto; toda mi vida estuvieron para mí y son mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida y ayudarme a haber cumplido todo lo que me he propuesto, a mis abuelos porque nunca dudaron de mí y siempre fueron mi apoyo incondicional, a mi madre por seguirme y a toda mi familia por su amor inmutable.

A mi mejor amiga y compañera de carrera Karen Bernal por su amistad incondicional por tantos años, su fuerza y su alegría contagiosa.

A mis compañeros de carrera por su amistad y apoyo en estos años de preparación, Isabela Duran, Harold Cespedes, Karen Sandoval, Juan Jair y Yulieth Narvarro.

A mi Director de tesis, M.Sc. Pedro Eslava por acompañarme y guiarme en este proceso de aprendizaje, por tenerme paciencia y compartirme su sabiduría.

A mi Codirectora de tesis, Ph.D. Yohana Velasco por encaminarme por la dirección correcta y corregirme con sensatez.

A Angie Liseth León por ser una compañera ejemplar, por su tutoría y acompañamiento.

Al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL), por la disposición de sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.

| TABLA DE CONTENIDO | | Pagina |
|---|--|---------------|
| CAPITULO 1: Informe final | | 6 |
| CAPITULO 2: Artículo científico resultado de investigación | | <u>74</u> |

CAPITULO 1

| TABLA DE CONTENIDO | Página |
|---------------------------|---------------|
|---------------------------|---------------|

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 13 |
| 2. ABSTRACT..... | 14 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 15 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 20 |
| 5. OBJETIVOS..... | 21 |
| 5.1. Objetivo general | 21 |
| 5.2. Objetivos específicos..... | 21 |
| 6. JUSTIFICACIÓN..... | 22 |
| 7. MARCO REFERENCIAL..... | 24 |
| 8. METODOLOGÍA..... | 28 |
| 8.1. Sitio de estudio..... | 28 |
| 8.2. Animales experimentales | 28 |
| 8.3. Sustancias experimentales..... | 28 |
| 8.4. Diseño experimental..... | 28 |
| 8.5. Concentración letal 50 (CL ₅₀)..... | 29 |
| 8.6. Determinación de la CL ₅₀ | 30 |
| 8.7. Efectos del CaCO ₃ | 30 |
| 8.8. Parámetros de calidad de agua | 31 |
| 8.9. Análisis estadístico..... | 31 |
| 9. RESULTADOS..... | 32 |
| 9.1. Parámetros de calidad de agua..... | 32 |

| | | |
|------|---|----|
| 9.2. | Concentración letal 50 (CL ₅₀)..... | 32 |
| 9.3. | Signos clínicos..... | 35 |
| 9.4. | Hallazgos de necropsia..... | 36 |
| 9.5. | Hallazgos de histopatología..... | 39 |
| 9.6. | Efectos del CaCO ₃ | 46 |
| 9.7. | Signos clínicos | 47 |
| 9.8. | Hallazgos de necropsia | 48 |
| 10. | DISCUSIÓN..... | 49 |
| 11. | CONCLUSIONES..... | 56 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Estructura teórica de POEA, modificada de Tush <i>et al.</i> , 2013..... | 17 |
| Figura 2. Valor de CL ₅₀ del POEA a 96 horas en juveniles de cachama blanca <i>Piaractus brachypomus</i> . El valor de CL ₅₀ fue calculado mediante el programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0..... | 34 |
| Figura 3. Mortalidad de juveniles de cachama blanca expuestos a diferentes concentraciones de POEA TA15 durante 96 horas | 34 |
| Figura 4. Signos clínicos evidentes en individuos de cachama blanca ante la exposición de POEA en el transcurso de 96 horas. | 36 |
| Figura 5. Hallazgos macroscópicos en individuos expuesto a POEA en tratamiento control, 5 (2 mg/L) y 6 (4mg/L)..... | 38 |
| Figura 6. Piel de individuos expuestos a POEA de tratamiento control y 4 (1 mg/L) (40x. H&E) | 39 |
| Figura 7. Branquias de individuos expuestos a POEA en tratamiento control, 5 (2 mg/L) y 6 (4mg/L). (40x. H&E) | 41 |
| Figura 8. Hígado de individuos expuestos a POEA en tratamiento control (40x) y 6 (4 mg/L) (10x y 40x. H&E) | 42 |
| Figura 9. Telencéfalo de individuos expuestos a POEA en tratamiento control, 5 (2 mg/L) y 6 (4 mg/L (40x. H&E) | 43 |
| Figura 10. Sacum vasculosum de individuos expuestos a POEA en tratamiento control y 6 (4 mg/L) (40x. H&E) | 44 |
| Figura 11. Riñón craneal de individuos expuestos a POEA en tratamiento control (10x) y 5 (2 mg/L) (40x. H&E) | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 12. Riñón posterior de individuos expuestos a POEA en tratamiento control (0mg/L) y 3 (0,5 mg/L) (40x. H&E) | 46 |
| Figura 13. Hallazgos macroscópicos en individuos de cachama blanca expuestos a POEA TA15 y CaCO ₃) | 49 |

LISTA DE TABLAS

Página

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Niveles tóxicos de POEA para varias especies. Modificada de e Tush <i>et al.</i> , (2013)..... | 18 |
| Tabla 2. Parámetros de calidad de agua en fase experimental. | 32 |
| Tabla 3. Mortalidad de juveniles de cachama blanca <i>Piaractus brachypomus</i> expuestos a 6 diferentes concentraciones de POEA TA15 durante 96 horas..... | 33 |
| Tabla 4. Signos clínicos manifiestos ante la exposición de POEA en el transcurso de 96 horas..... | 35 |
| Tabla 5. Mortalidad de juveniles de cachama blanca <i>Piaractus brachypomus</i> en 4 concentraciones de POEA y CaCO ₃ durante 48 horas..... | 47 |
| Tabla 6. Signos clínicos manifiestos ante la exposición de POEA en el transcurso de de horas..... | 48 |

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

| Símbolo | Termino |
|-----------------------------|----------------------------------|
| ANEO | Aquil Amina Etoxilada |
| POEA | Alquil Amina Polietoxilada |
| CaCO₃ | Carbonato de calcio |
| CGE | Células granulares eosinofílicas |
| CM | Células mast |
| CMM | Centros melanomacrófagos |
| CL₅₀ | Concentración letal cincuenta |
| g | Gramo |
| H&E | Hematoxilina eosina |
| L | Litro |
| LC₅₀ | Lethal concentration fifty |
| mg | Miligramo |
| TTO | Tratamiento |
| \bar{X} | Promedio |
| \pm | Más/menos |
| σ | Desviación estándar |

EFFECTO DEL ALQUIL-AMINA-POLIETOXILADA (POEA) Y CaCO_3 EN
***Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)**

Estudiante

Annyi Lizeth Vargas Pulido

Estudiante de X semestre de Biología de la Universidad de los Llanos

Director

Pedro Rene Eslava Mocha

Médico Veterinario, Universidad Nacional de Colombia

MSc. En Sanidad Animal, Universidad Nacional de Colombia

Codirectora

Yohana María Velasco Santamaría

Medico Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia

MRes en Biología Aplicada de Peces (Homologado por el MEN en MSc en Acuicultura) University of Plymouth, Inglaterra

PhD en Biología (Área de Ecotoxicología) University of Southern Denmark, Dinamarca.

1. RESUMEN

Con el propósito de profundizar en los aspectos de patología toxicológica y ambiental asociados a la exposición a herbicidas con base en glifosato y surfactantes acompañantes, tales como las aminas etoxiladas, en especies ícticas nativas bajo exposiciones subletales con énfasis en los efectos en la fisiopatología del sistema nervioso de especies. Se efectuó un primer ensayo de CL_{50} para el compuesto Alquil-Amina-Polietoxilada POEA-TA15, exponiendo juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus* a seis tratamientos durante un periodo de 96h, siete animales por acuarios de 50L con tres réplicas y un segundo ensayo con 4 tratamientos para determinar los efectos del $CaCO_3$ ante la exposición a concentraciones letales del surfactante (POEA- TA-15). En los ensayos se mantuvieron parámetros fisico-químicos del agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad) adecuados para la especie. Se registraron signos clínicos (letargia, disgregación, posición en columna de agua, pérdida del eje de nado y angustia respiratoria), lesiones externas (erosión aletas y piel), mortalidad y hallazgos en la necropsia para cada tratamiento. La CL_{50} para TA15 fue de 2,08mg/L calculada por el método Trimmed Spearman-Kärber siendo así considerado como altamente tóxico para la cachama blanca, que produce lesiones severas en piel, branquias, hígado y telencéfalo.

Palabras clave: *Surfactante, POEA, Herbicidas, Toxicidad aguda, Piaractus brachypomus.*

2. ABSTRACT

With the purpose of deepening the aspects of toxicological and environmental pathology associated with exposure to herbicide mixtures based on glyphosate and accompanying surfactants, such as ethoxylated amines, in native fish species under sublethal exposures with emphasis on the effects on the physiopathology of the nervous system of species. A first test of LC_{50} was carried out for the compound Alkyl-Amine-Polyethoxylated POEA-TA15, exposing juveniles of red-bellied pacu *Piaractus brachypomus* to six treatments during a period of 96h, seven animals per aquarium of 50L with three replicas and a second test with 4 treatments to determine the effects of $CaCO_3$ on exposure to lethal concentrations of surfactant (POEA-TA-15). In the tests, physico-chemical water parameters (temperature, dissolved oxygen, pH, conductivity) suitable for the species were maintained. Clinical signs (lethargy, disintegration, position in the water column, loss of the swim axis and respiratory distress), external injuries (fin and skin erosion), mortality and necropsy findings for each treatment were recorded. The LC_{50} for TA15 was 2,08mg/L calculated by the Trimmed Spearman-Kärber method, which is considered highly toxic for red-bellied pacu, which produces severe lesions in skin, gills, liver and telencephalon.

Key words: *Surfactant, POEA, Herbicides, Acute toxicity, Piaractus brachypomus.*

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En general, los pesticidas se usan para el control de plagas, plantas parásitas o malezas, además de su acción exfoliante y desencadenante (Fernicola, 1985; Wehtje & Walker, 1997). A nivel mundial son de uso común los agroquímicos y plaguicidas para el mantenimiento de cultivos y algunos herbicidas tales como el glifosato y sus mezclas, se implementaron en el país con la política de erradicación de cultivos ilícitos (Nivia, 2000) y en los últimos años se ha incrementado el uso de estas sustancias en monocultivos agroindustriales tales como la soya, el arroz y la palma de aceite, así como en silvicultura y manejo de zonas verdes en áreas urbanas (Argüello-Rangel, *et al.*, 2015; Serrano, 2016).

El glifosato (N-fosfonometilglicina) es un herbicida utilizado para el mantenimiento de cultivos agrícolas, control de cultivos ilícitos, erradicación de malezas, y control de algas (Solomon *et al.*, 2007). El gobierno nacional nuevamente autorizó el empleo de este agroquímico para su uso como fumigación terrestre localizada y a pesar que muchos estudios reportan sus efectos deletéreos sobre el medio ambiente, su uso continua en algunas regiones del país (El País, 2017); generando además problemas de salud pública (Varona *et al.*, 2009), daños irreversibles en perifiton, invertebrados, anfibios y peces (Salazar-López & Madrid, 2011; Vera, 2011; Álvarez *et al.*, 2012; Ruiz-Toledo y Sánchez-Guillén, 2014; Henao-Muñoz, 2014).

Estudios toxicológicos han determinado el papel de las sustancias acompañantes como los surfactantes y adyuvantes que se añaden al producto principal con el fin de mejorar los resultados que el solo glifosato no obtendría (Witt, 1998; Ducar *et al.*, 2003). Los surfactantes son sustancias tensoactivas que al disolverse en agua u otra sustancia se concentran en interfaces químicas, por lo general son compuestos anfifílicos, es decir, que poseen un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico, por lo tanto, reduce la tensión superficial facilitando la adhesión del herbicida en la planta (Tu y Randall, 2003). Adicionalmente, modifican el proceso de osmosis de la membrana celular, transformando el mecanismo de transporte de membrana y asociando al organismo con el herbicida (Ramírez *et al.*, 2009).

El polioxi-etileno-amina (POEA) es un surfactante derivado del sebo (tallowaminas) el cual es un tensoactivo no iónico/catiónico derivado de grasas de origen animal, perteneciente a una clase más grande de sustancias denominadas alquilaminas etoxiladas (ANEO), las cuales están conformadas por una molécula de amina, en contraposición al grupo alquilamina y dos cadenas de alcohol (Tush *et al.*, 2013), caracterizado por un óxido la seboamina (Brausch, & Smith, 2007); variable en su cadena alquilo de 18 carbonos (14-18 C) y dos cadenas de etoxilos 14 (EO) (promedio de 15 C), (Lansurf TA15 de Lankem ®) POEA-TA15 presentación comercial que son prescritas para uso común con glifosato presentes en fórmulas de herbicidas de la marca Roundup® (Giesy *et al.*, 2000). A conocimiento de los autores no existen reportes de la toxicidad de tales sustancias en peces nativos de la Orinoquia.

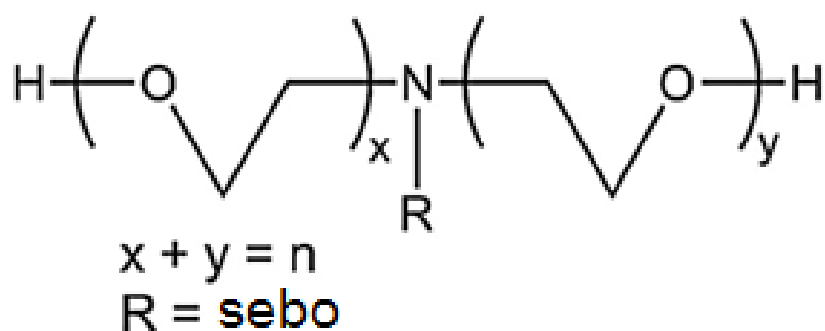


Figura 1. Estructura teórica de POEA, modificada de Tush *et al.*, 2013

El POEA es un componente de la formulación comercial del glifosato Roundup® la cual presenta en su composición, por ejemplo, en el Roundup® Ultra un 41,5% de glifosato y 16% de POEA (Arcos & Figueroa, 2007). Algunas agencias reguladoras y organizaciones científicas (Health Canadá, EPA, entre otras) aseguran que es un ingrediente inerte, es decir, que no se considera nocivo por su baja toxicidad, riesgo ambiental nulo y no es peligroso para los organismos ante una exposición directa (OMS, 1994; Williams *et al.*, 2000); aunque se estima que es más tóxico que el glifosato (Birch, 1977; Marc *et al.*, 2002; Martínez y Brown, 1991); también este le proporciona mayor efectividad y propiedades tóxicas distintas (Servizi, Gordon & Martens, 1987). Se indica que causa afecciones gastrointestinales, deterioro sistema nervioso central, genera destrucción de glóbulos rojos y ocasiona problemas respiratorios en humanos (Nivia, 2000). De la misma manera, Tush *et al.*, (2013) reportan altos niveles de letalidad en *Daphnia magna* (pulga de agua), *Lampsilis siliquoidea* (almeja), *Acartia tonsa* (copépodo), entre otras especies con dosis bajas de exposición a POEA como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Niveles tóxicos de POEA para varias especies. Modificada de Tush *et al.*, (2013).

| Especies | CL ₅₀ (mg/L) | Referencia |
|--|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Daphnia magna</i> (pulga de agua) | 0.097 | (Brausch <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Lampsilis siliquoidea</i> (mejillón) | 0.5 ^a | (Bringolf <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Acartia tonsa</i> (copépodo) | 0.57 | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Rana pipiens</i> (rana leopardo del norte) | 0.68 | (Moore <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Bufo fowleri</i> (sapo cazador) | 0.80 | (Moore <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Rana catesbeiana</i> (rana toro americana) | 0.83 | (Moore <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Pimephales promelas</i> (pececillo cabezón) | 1.0 | (Folmar <i>et al.</i> , 1979) |
| <i>Rana clamitans</i> (rana verde) | 1.1 | (Howe <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> (pulga de agua) | 1.15 | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Rana clamitans</i> (rana verde) | 1.32 | (Moore <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Salmo gairdneri</i> (trucha arcoiris) | 2.0 | (Folmar <i>et al.</i> , 1979) |
| <i>Daphnia pulex</i> (pulga de agua) | 2.00 | (Servizi <i>et al.</i> , 1987) |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> (camarón hada) | 2.01 | (Brausch & Smith, 2007) |
| <i>Oncorhynchus nerka</i> (salmón rojo) | 2.60 | (Servizi <i>et al.</i> , 1987) |
| <i>Lepomis macrochirus</i> (pez luna azul) | 3.0 | (Folmar <i>et al.</i> , 1979) |
| <i>Skeletonema costatum</i> (algas) | 3.35b | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Oncorhynchus kisutch</i> (salmón coho) | 3.50 | (Servizi <i>et al.</i> , 1987) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> (algas) | 3.92b | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoos) | 4.96b | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Euplotes vannus</i> (protozoos) | 5.00b | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Xenopus laevis</i> (rana africana con garras) | 6.8 | (Perkins <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Vibrio fischeri</i> (bacteria) | 10.2b | (Tsui & Chu, 2003) |
| <i>Chironomus plumosus</i> (larvas de mosquito) | 13 | (Folmar <i>et al.</i> , 1979) |
| <i>Ictalurus punctatus</i> (bagre de canal) | 13 | (Folmar <i>et al.</i> , 1979) |

Niveles tóxicos de POEA para varias especies. La CL₅₀ representa la concentración que es fatal para el 50% de la población.

a. CE50 (concentración efectiva que inmoviliza al 50% de la población).

b. IC50 (concentración que inhibe el crecimiento en el 50% de la población).

La toxicidad y modo de acción del surfactante POEA son alterados considerablemente en presencia de sedimentos, es decir, en aguas con mayor porcentaje de arcilla, carbono y masa microbiana; además este hecho disminuye el riesgo de contaminación de las aguas y la posible intoxicación de los individuos que se encuentren en ellas (Wang *et al.*, 2005), dicho proceso de adsorción del surfactante por partículas orgánicas sucede por la presencia de moléculas hidrofóbicas e hidrofílica (O'melia, 1989) que generan la unión del POEA a sólidos en suspensión por este motivo se considera utilizar carbonato de calcio (CaCO_3) en casos de campo, lo cual mitigaría los efectos de surfactante no iónico (Rodríguez-Gil, 2016).

Piaractus brachypomus comúnmente llamada cachama blanca pertenece a la familia Characidae, es nativa de la Amazonia y Orinoquia (Díaz y López, 1993); es considerada una buena alternativa de producción piscícola por su rápido crecimiento, alta adaptabilidad, resistencia a enfermedades y cambios del medio y alta comercialización de su carne (Arias, 1988; Hernández, 1994). Igualmente, se considera una especie con un alto potencial para el mejoramiento genético (Granda & Aguirre, 2016). A conocimiento de autores no se conocen reportes de toxicidad aguda del POEA en esta especie, por lo tanto, surgen las siguientes preguntas:

¿Tiene efectos tóxicos el POEA a nivel de laboratorio en cachama blanca *Piaractus brachypomus*?

¿Cuáles pueden ser los efectos en relación con los signos clínicos, lesiones macro y microscópicas ante la exposición aguda de POEA en cachama blanca *Piaractus brachypomus*?

¿Puede el CaCO_3 disminuir o contrarrestar los efectos del POEA?

4. HIPÓTESIS

H₀: No se produce ningún efecto por la exposición de juveniles de cachama blanca al POEA.

H₁: El POEA induce respuestas de toxicidad aguda en los juveniles de cachama blanca como signos clínicos y lesiones.

H₂: El POEA genera toxicidad letal sobre juveniles de cachama blanca.

H₃: El efecto tóxico del POEA sobre juveniles de cachama blanca se verá inhibido por la presencia de CaCO_3 .

5. OBJETIVOS

5.1 General

Contribuir al conocimiento de los efectos toxicológicos de surfactantes que se emplean como adyuvantes en formulaciones de herbicidas sobre peces nativos de la Orinoquia.

5.2 Específicos

- Determinar la CL₅₀ de POEA en juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*.
- Describir los principales signos clínicos y lesiones macro y microscópicas inducidas por la exposición a POEA en juveniles de cachama blanca.
- Establecer el efecto de CaCO₃ ante la toxicidad a concentraciones letales de POEA en juveniles de cachama blanca

6. JUSTIFICACIÓN:

Durante décadas los Llanos Orientales han sido expuestos a diversos procesos de transformación que implica el uso de los suelos para actividad petrolera, minería, ganadera, procesos agrícolas y cultivos ilícitos (Baptiste, 2006) estos últimos con los años han aumentado junto con el uso de pesticidas, contaminando no solo la vegetación, sino los humedales. La región abarca más del 50% de los humedales de Colombia, por lo tanto, comprende una diversidad de ecosistemas acuáticos que abarcan aproximadamente más del 40% de los peces del país (Maldonado-Campo et al., 2009). Por ello es importante evaluar los efectos que los pesticidas generan sobre organismos nativos.

Simultáneamente con su acción sobre las plantas los herbicidas como el glifosato alteran los ciclos de vida de especies no blanco (Ostera *et al.*, 2016).; estudios manifiestan daños sobre organismos (Eslava, 2007; Vera, 2011, Henao et al., 2015; Ramírez, 2012; Ruiz-Toledo y Sánchez-Guillén, 2014), aunque las autoridades niegan su carácter tóxico, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) dio aviso sobre los posibles efectos cancerígenos del glifosato, con base a los estudios realizados a nivel mundial IARC, (2015).

Con base a lo anterior, urge tomar medidas al respecto puesto que se ubica a la Orinoquia como una región amenazada, por el impacto de dichos herbicidas y sus derivados sobre la biodiversidad y el normal funcionamiento de los sistemas biológicos (Romero-Ruiz *et al.*, 2012). La importancia de desarrollar estos estudios

radica en la búsqueda de soluciones a una problemática social, económica y de salud pública que afecta desde la creación del proyecto de erradicación de cultivos ilícitos y actualmente repercute sobre la decisión que tomó el Consejo Nacional de Estupefacientes donde nuevamente retomar el uso de este agroquímico a pesar de los diferentes estudios e informes de la Organización Mundial de la Salud (Justicia, 2016).

Previamente, se han descrito los peces como organismos modelos para realizar ensayos toxicológicos puesto que son sensibles a los cambios del medio (Bundschuh *et al.*, 2012). Para la presente investigación se escogió la cachama blanca por ser una especie nativa de las cuencas del Orinoco y Amazonas, altamente contaminadas por fumigaciones directas e indirectas y su hábitat está expuesto a ello (Eslava-Mocha *et al.*, 2007). Existe poca información sobre los efectos de POEA en organismos acuáticos y no hay información sobre especies nativas de la Orinoquia Colombiana.

7. MARCO DE REFERENCIA:

Los contaminantes ambientales son toda clase de sustancias que han sido introducida al ambiente, generalmente de origen antropogénico causando efectos perjudiciales sobre los ecosistemas asociados y los organismos que dependen de ellos (Harte *et al.*, 1991), entre estos se encuentran los plaguicidas que son considerados sustancias o combinación de sustancias empleadas en el control de plagas, malezas y cualquier tipo de planta no deseada (Ramírez y Lacasaña, 2001), también los herbicidas, los cuales son productos fitosanitarios que son utilizados para exterminar y/o controlar las malezas (Nicholls y Altieri, 1997). Adicional a ellos existen compuestos que modifican los efectos de otros, en algunos casos para incrementar el rendimiento sin alterar su naturaleza del mismo estos son llamados adyuvantes (Foy & Pritchard, 1996) y se encuentran en combinación con varios agroquímicos como por ejemplo Roundup® en su presentación comercial.

El POEA es un adyuvante tensoactivo no iónico derivado del sebo, lo que quiere decir que es un producto derivado del tejido graso de vacas u ovejas nombrado químicamente como aminado graso polioxietileno, que promueve la penetración de herbicidas en la cutícula de las plantas (Brausch, & Smith, 2007). La ficha de datos de seguridad indica que es líquido de color ámbar, presenta un pH 9 a 11 (1% acuoso), parcialmente soluble en agua y con densidad de 1,03 g/cm³ [20°C (68°F)]. Es utilizado en presentaciones como Visión^{MD} y Roundup® en una medida aproximada de 15% (Giesy *et al.*, 2000; Onil, 2001). Diamond y Durkin (1997)

indican que el POEA está categorizado en lista 3 de ingredientes inertes de la U.S EPA, esto quiere decir que es considerado un ingrediente inerte estimado como no predominante en términos de reglamentación y de baja peligrosidad, sin embargo, la ficha técnica del producto indica que causa ardor en ojos grado 1, toxicidad aguda categoría 4, toxicidad aguda y crónica en organismos acuáticos grado 1. (Lankem.eu., 2018).

Las fumigaciones de agroquímicos como el Glifosato (GP) y el Paraquat se llevan realizando en el país a partir de los años 70 bajo la política de aspersión de cultivos ilícitos, como consecuencia de la considerable producción de cultivos de marihuana y coca, siendo este control coordinado por la Dirección Nacional de Estupefacientes (DNE) (Gamboa, 1998); este programa de aspersión aérea fue suspendido por el gobierno el 15 de mayo del 2015 debido a los informes presentados por la Organización mundial para la salud que indican posibles problemas para la salud pública y del medio ambiente (Justicia, 2016), sin embargo, actualmente el Consejo Nacional de Estupefacientes (CNE) autoriza nuevamente la erradicación de cultivos con glifosato mediante aspersión terrestre localizada encendiendo la alarmas por el peligro que implica (El País, 2017). Entra en consideración la resistencia de algunos cultivos por manipulación genética (Salazar y Aldana, 2011; González-Torralva *et al.*, 2013) esto ha sido detonante al aumento del uso de GP y sus acompañantes (POEA) en su presentación Roundup® que es una de las más comercializadas del país.

Son escasos los estudios realizados sobre los efectos que puede causar el POEA, sin embargo, hay alguno que indican que a bajas concentraciones generan efectos genotóxicos, presentan daño de la membrana celular después de la exposición y provocan más estrés que otros tensoactivos (Nobels *et al.*, 2011). Señalan Mottier *et al.*, (2014) y Brausch & Smith, (2007) que es muy tóxico para invertebrados acuáticos, con base a los ensayos realizados en crustáceos *Crassostrea gigas* y *Thamnocephalus platyurus* respectivamente, siguiendo la línea de invertebrados Folmar *et al.*, (1979) demostraron que este surfactante es muy tóxico para las larvas de mosquitos *Plumosus chironomus*; sin embargo también se han realizado estudios de los efectos sobre otros grupos de animales, en anfibios (Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2005), peces (Navarro y Martínez, 2014) los cuales ante la exposición no responden a estímulos de estrés. En células humanas neonatales *in vitro* se reveló el daño en membrana alterando la estructura y su funcionalidad lo cual conlleva a la necrosis (Benachour y Séralini, 2008).

Incluso resultados del estudio de Wang *et al.*, (2005) señalan que la toxicidad del surfactante se puede ver afectada rápidamente por la presencia de sedimento, aún más en aguas de poca profundidad, sin embargo, entra en consideración la influencia de la flora microbiana que genera procesos de degradación y absorción de sustancias (Giesy *et al.*, 2000). Es importante considerar los efectos directos en indirectos que generan la contención con POEA en ecosistemas acuáticos, puesto que Rankine (2015) asegura la persistencia de estas sustancias en el ambiente y los sedimentos. Con base a esta clase de afirmaciones se han venido desarrollando trabajos como los de Ross y Liao, (2015) en donde cuantifican los

tensoactivos, realizando una descripción por primera vez del destino de las mezclas de uso agrícola de POEA en ambientes acuáticos.

Así mismo, es transcendental el trabajo toxicológico con peces puesto que están directamente relacionados con la calidad del agua (Yanong, 2003) por lo tanto, se trabajó con cachama blanca *Piaractus brachypomus* una especie íctica nativa estimada como una de las más importantes de la acuicultura nacional (Navarro *et al.*, 2004).

8. METODOLOGÍA

8.1 Sitio de estudio

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioensayos del IALL, en la Estación Piscícola de la Universidad de los Llanos, vereda Barcelona, Villavicencio-Meta, Colombia, con coordenadas 4°04'27.8"N 73°34'52.1"W.

8.2 Animales experimentales

Los individuos de estudio fueron juveniles de cachama blanca, *Piaractus brachypomus*, obtenidos de un mismo desove, clínicamente sanos con un peso corporal promedio de $5 \pm 2,4$ g y longitud promedio de $5 \pm 0,7$ cm.

8.3 Sustancias experimentales

Se utilizó POEA Polietoxi-etil-amina, compuesto de aminas de sebo etoxiladas polimerizadas, 100% de concentración (Lansurf TA15 de Lankem ®). Se empleó carbonato de calcio CaCO_3 : grado analítico. (Calcium carbonate ReagentPlus®; CAS Number: 471-34-1, Sigma-Aldrich, Alemania).

8.4 Diseño experimental

Se empleó un sistema semi-estático, en acuarios con aireación continua donde inicialmente se procedió a someter a un tratamiento con sal marina no yodada a una concentración de 0,5 g/L como medida profiláctica por tres días al momento de iniciar aclimatación. El periodo de aclimatación se hizo por 7 días, controlando los parámetros fisicoquímicos bajo unos intervalos de temperatura de 24 a 26 °C; pH $7 \pm 0,5$ y oxígeno disuelto $6,0 \pm 0,5$ mg/L aproximadamente, además los

animales fueron alimentados antes de comenzar los ensayos. Se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

8.5 Concentración letal 50 (CL₅₀)

El primer experimento determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) a 96 h de POEA, para lo cual se emplearon juveniles de cachama blanca (n=144), de un peso aproximado de 5,9 g, distribuidos en tanques de 50 L, correspondientes a 6 tratamientos, cada uno de 8 individuos. Se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento. Los tratamientos fueron:

- 1) **TT01** Control (0 mg/L),
- 2) **TT02** POEA (0,2 mg/L),
- 3) **TT03** POEA (0,5 mg/L),
- 4) **TT04** POEA (1 mg/L),
- 5) **TT05** POEA (2 mg/L)
- 6) **TT06** POEA (4 mg/L)

Estas concentraciones se propusieron con base en lo hallado por Navarro y Martínez, (2014) quien efectuó dicho ensayo en *Prochilodus lineatus*. Así mismo, se tuvieron en cuenta los hallazgos de Giesy *et al.*, (2000) en los cuales analizaron concentraciones ambientales reales.

8.6 Determinación de la CL₅₀

El valor de CL₅₀ se calculó mediante el programa Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977), siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. Para el empleo del programa, se requirió las dosis del agente tóxico utilizado, el intervalo logarítmico entre las dosis, los valores de mortalidad, el número de animales utilizados en cada dosis y el intervalo de confianza del 95% para la misma.

8.7 Efectos del CaCO₃

En el segundo experimento fueron empleados juveniles de cachama blanca (n=56) de un peso aproximado 5 g distribuidos en acuarios de 50 L, correspondientes a 4 tratamientos, cada uno de 7 individuos. Se realizaron 2 réplicas para cada uno de los tratamientos; los individuos fueron sometidos a la CL₅₀ de POEA en un sistema semi-estático durante 48 horas, los tratamientos se describen a continuación:

- 1) **TT01** Control (0 mg/L)
- 2) **TT02** CaCO₃ (60 mg/L)
- 3) **TT03** POEA (2,1 mg/L)
- 4) **TT04** POEA (2,1 mg/L) + CaCO₃ (60 mg/L)

Para describir los signos clínicos y lesiones de los animales de los diferentes grupos experimentales se siguieron los lineamientos descritos por Yanong (2003) en relación con los aspectos: posición del animal en la columna de agua, eje de nado, patrón respiratorio, lesiones macroscópicas en la piel, aletas, órganos internos y lesiones microscópicas en branquias, hígado, riñón y cerebro

especialmente. Algunos animales que murieron durante el experimento y algunos de los que sobrevivieron a las 72 horas, fueron procesados para histopatología convencional, mediante fijación por medio de formalina bufferada 4%, e inclusión de tejidos en parafina y corte y coloración con hematoxilina eosina H&E según el método estándar para evaluación histopatológica (Luna, 1968). Se procesaron para histopatología 5 animales por tratamiento, donde de cada uno se tomaron muestras de piel, branquias, hígado y encéfalo, de cada órgano se hicieron 3 cortes para exámenes histopatológico y desarrollar la evaluación de lesiones.

8.8 Parámetros de calidad de agua

Los parámetros de calidad del agua fueron medidos diariamente y ajustados dentro de los rangos normales para la especie (Sánchez-Bain *et al.*, 2004).

8.9 Análisis estadístico

El valor de CL_{50} se determinó mediante el análisis de la mortalidad a las 96 horas por medio del programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0. Los datos se expresaron como media y desviación estándar, con un valor $p < 0.05$ considerado como significativo.

9. RESULTADOS

9.1 Parámetros de calidad de agua Los parámetros de la calidad de agua se registraron diariamente a las 9:00 a.m., en la tabla 2 se encuentra el promedio de los registros diarios realizados.

Tabla 2. Parámetros de calidad de agua en fase experimental.

| Parámetros | Temperatura (°C) | pH | Oxígeno disuelto (ppm) |
|----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| Día 1 \bar{X} | 26,2 | 7,6 | 7,2 |
| Día 2 \bar{X} | 26,9 | 7,3 | 7,15 |
| Día 3 \bar{X} | 26 | 6,6 | 7 |
| $\bar{X} \pm \sigma$ | $26,03 \pm 0,1527$ | $7,16 \pm 0,5131$ | $7,11 \pm 0,010$ |

Los valores son expresados como promedio \pm desviación estándar.

9.2 Concentración letal 50 (CL₅₀) La toxicidad aguda a 96 horas en juveniles de cachama blanca en condiciones controladas mostró mortalidad solo en los tratamientos con 2 y 4 mg/L de POEA TA15. La mortalidad inicio a las 36 horas de exposición al tóxico en la concentración de 2 mg/L y a partir de la primera hora para la concentración de 4 mg/L.

Tabla 3. Mortalidad de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus* expuestos a 6 diferentes concentraciones de POEA TA15 durante 96 horas, n=24.

| Tiempo (h) | POEA TA15 (mg/L) | | | | | |
|--------------|------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | TTO1 (0) | TTO 2 (0,2) | TTO 3 (0,5) | TTO 4 (1) | TTO 5 (2) | TTO 6 (4) |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 24 |

| CL ₅₀ | 95% Intervalo confianza | |
|------------------|-------------------------|----------|
| mg/L | Inferior | Superior |
| 2,080 | 1,799 | 2,405 |

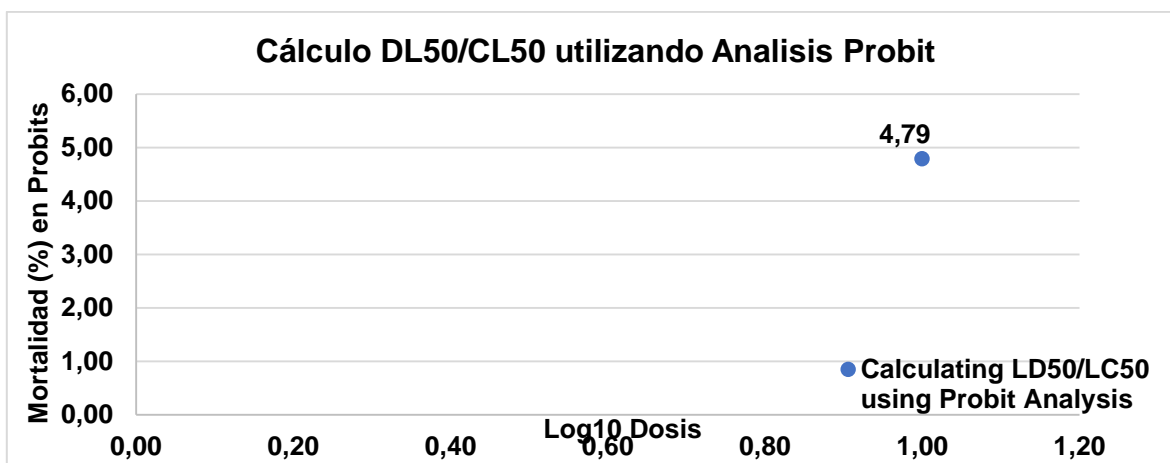


Figura 2. Valor de CL₅₀ del POEA a 96 horas en juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. El valor de CL₅₀ fue calculado mediante el programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0

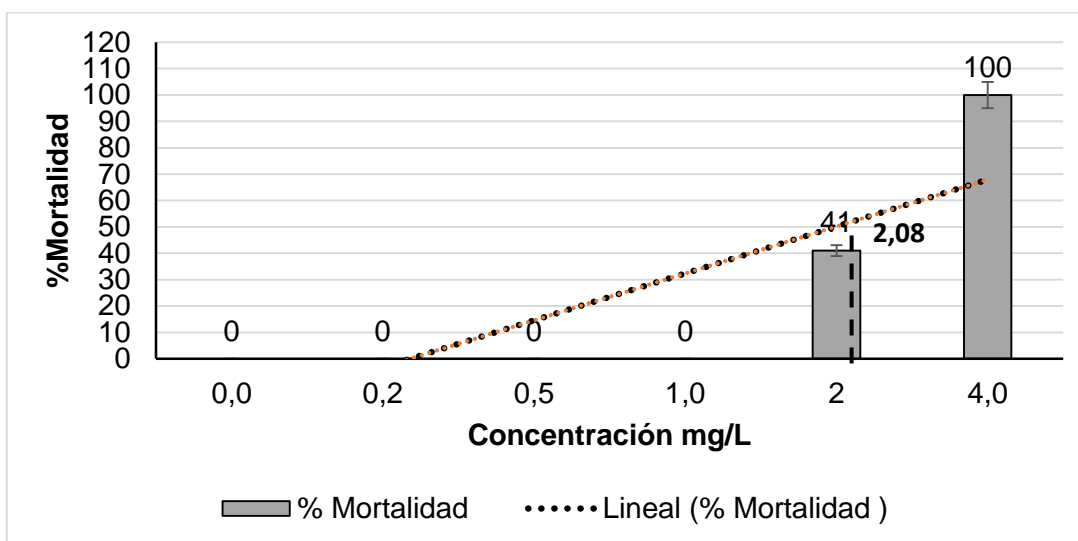


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de juveniles de cachama blanca expuestos a diferentes concentraciones de POEA TA15 durante 96 horas.

9.3 Signos clínicos. Mediante el seguimiento cada cuatro horas a los signos clínicos se halló que los animales expuestos a 1 mg/L de POEA no evidenciaron cambios en el patrón de nado hasta las 48 horas, posterior a las cuales se evidenciaron pérdida de comportamiento grupal y angustia respiratoria. En el grupo expuesto a 2 mg/L se identificó letargo y pérdida del comportamiento grupal a las 5 horas, lo cual difiere de lo hallado en el grupo de 4 mg/L de POEA en el cual el letargo fue evidente a los 10 minutos y las alteraciones del comportamiento grupal después de una hora. Finalmente, en las concentraciones de 2 y 4 mg/L fue evidente el nado errático, pérdida del eje y prolapso del labio inferior, los peces a una hora de exposición ascendían su posición con respecto a la columna de agua hasta perecer (Tabla 6).

Tabla 4. Signos clínicos manifiestos ante la exposición de POEA en el transcurso de 96 horas.

| TTO / Signos clínicos | Letargo | Perdida de comportamiento grupal | Angustia respiratoria | Cambio en patrón de nado | Perdida del eje de nado | Nado errático | Prolapso del labio inferior | Posición en la columna de agua |
|-----------------------|---|---|-----------------------|--|-------------------------|---------------|-----------------------------|--------------------------------|
| TTO 1 (control) | | | | | | | | Inferior |
| TTO 2 (0,2 mg/L) | | | | | | | | Inferior |
| TTO 3 (0,5 mg/L) | | | | | | | | Inferior |
| TTO 4 (1 mg/L) | X | x | x | x (a las 48 horas después de iniciado el experimento) | | | | Inferior |
| TTO 5 (2 mg/L) | X (a las 5 horas de iniciado el experimento) | x (a las 5 horas de iniciado el experimento) | x | | x | x | x | Medio |
| TTO 6 (4 mg/L) | X (A los 10 minutos de iniciado experimento) | x (A 1 hora de iniciado el experimento) | x | | x | x | x | Superior |

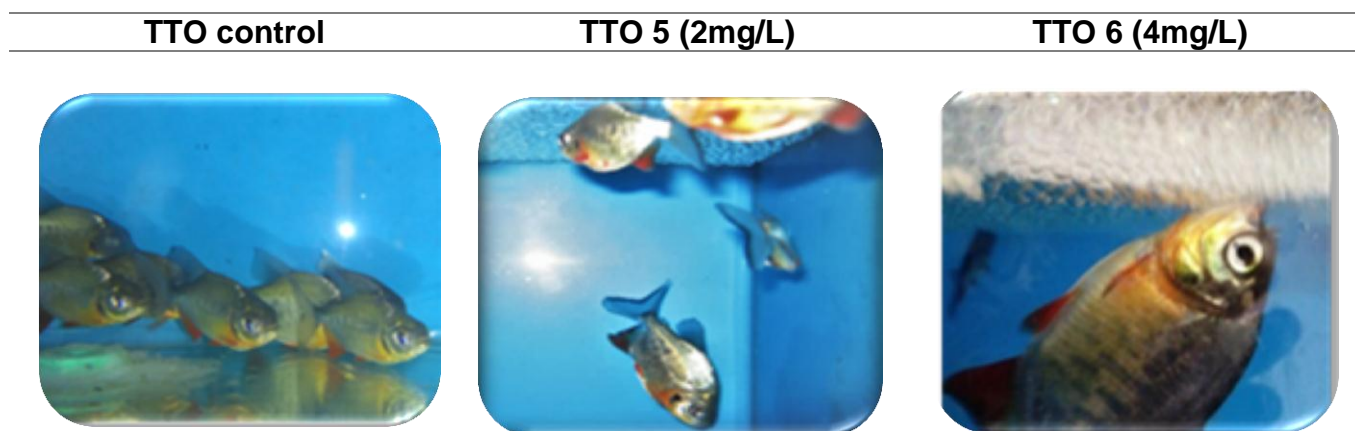


Figura 4. Signos clínicos en tratamiento control, 5 (2 mg/L) pérdida del comportamiento de cardumen y 6 (4mg/L) pérdida del eje de nado y posición superior en la columna de agua, ante la exposición de POEA en el transcurso de 96 horas.

9.4 Hallazgos de necropsia. En el tratamiento control no se halló ninguna anomalía evidente, a concentraciones de 0,2 mg/L se observó un leve cambio en la coloración en la piel, puesto que se tornó más oscura, congestión de branquias, aletas y piel. A concentraciones de 0,5 y 1 mg/L los individuos reflejan erosiones leves de aletas y piel, moderada congestión, hemorragias en boca, leve aumento de líquido abdominal y erosiones en el pedúnculo caudal.

A concentración de 2 y 4 mg/L de POEA TA15 fueron halladas erosiones en las aletas caudal, dorsal, pectoral y adiposa, cambios de coloración en la piel, hemorragias y erosiones en arcos branquiales, áreas de isquemia; a 2 mg/L se localizó áreas de congestión en la cavidad oral, erosiones pedunculares y aumento leve de líquido en cavidad abdominal, congestión y coloración moteada en riñón posterior, hemorragias en meninges además erosiones en pedúnculo caudal y a 4 mg/L hemorragias petequiales, congestión y hemorragia severa en cavidad oral a nivel de techo y base, hemorragia en arcos branquiales, aumento

del líquido de la cavidad celómica, hemorragias severas en meninges y erosiones en pedúnculo caudal (Figura 4).

TTO Control

TTO 5 (2 mg/L- TA15)

TTO 6 (4 mg/L-TA15)



Integridad de aletas y tegumento, foto a las 96 horas del experimento.



Lesiones necróticas en aleta adiposa y pedúnculo caudal pérdida de integridad de radios, erosiones en aleta dorsal, lesiones erosivas leves en piel. Foto a las 48 h de exposición



Lesiones leves en aletas y en la piel, boca abierta y opérculos dilatados en actitud de angustia respiratoria. Muerte antes de 12 h exposición



Integridad de branquias color rojo homogéneo a las 96 h.



Branquias congestionadas rojo intenso con edema leve. 48 h exposición.



Branquias, cambio de coloración con palidez en la región distal de los filamentos branquiales, edema moderado. 12 h exposición.



Encéfalo expuesto coloración rosácea homogénea normal.



Encéfalo expuesto con fuertes hemorragias en meninges y superficie encefálica.

Figura 5. Hallazgos macroscópicos en individuos expuesto a POEA en tratamiento control, 5 (2 mg/L) y 6 (4 mg/L).

9.5 Hallazgos de histopatología

Piel: En el tratamiento control no se evidenciaron alteraciones a nivel microscópico. A concentraciones de 0,2 mg/L se presentaron erosiones muy leves, a 0,5 mg/L leves erosiones de la epidermis, a 1 mg/L leve hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis. A 2 mg/L también se evidenció, pero en forma moderada, hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis y moderadas erosiones en epidermis. A 4 mg/L se hallaron erosiones moderadas en epidermis, úlceras, hemorragias e hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis (Figura 5).

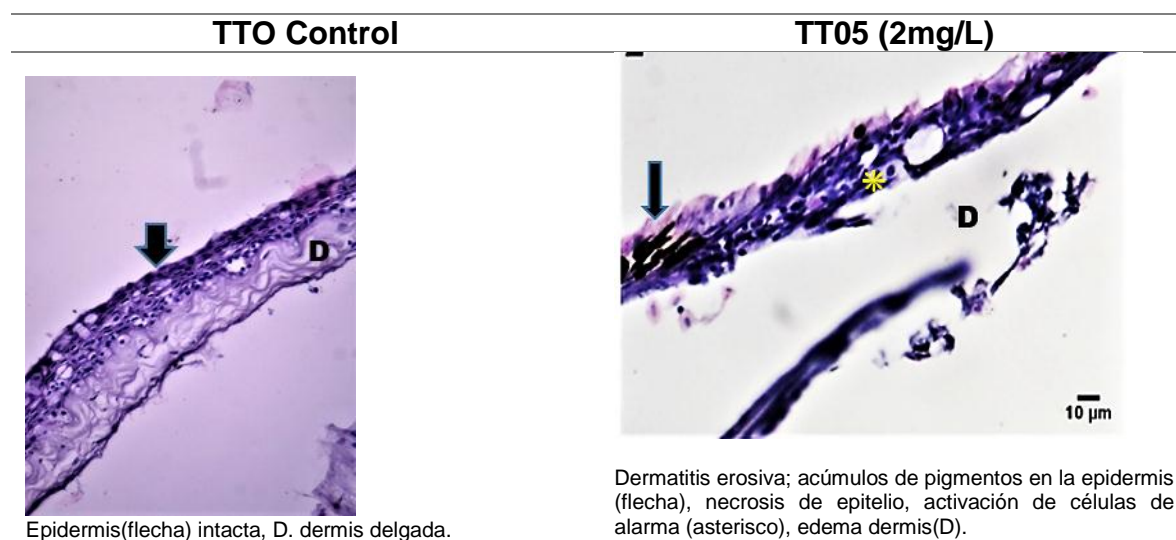


Figura 6. Piel de individuos expuestos a POEA de tratamiento TTO1 control y TT05 (1 mg/L) (10x. H&E).

Branquias: En el tratamiento control no se evidenciaron alteraciones branquiales significativas únicamente un leve desprendimiento epitelial, en términos generales mostraron sus estructuras en buen estado. Los peces expuestos a concentraciones de 0,2 mg/L presentaron una leve hipertrofia del epitelio interlamelar, a 0,5 mg/L se evidencia un leve edema intercelular y leve ruptura de células pilar, a 1 mg/L se presentó leve ruptura de la célula pilar y de forma moderada aneurisma lamelar y congestión de los filamentos, a 2 mg/L fue evidente de forma leve una fusión lamelar total, depósitos intracelulares, atrofia lamelar y atrofia del filamento, de forma moderada edema intercelular, fusión parcial lamelar, ruptura de pilar, desprendimiento epitelial, pleomorfismo nuclear, necrosis, hipertrofia del epitelio interlamelar, hipersecreción epitelial e hiperplasia epitelial arco, hiperplasia de células de moco, presencia de centros melanomacrófagos CMM e infiltración de leucocitos, de forma severa congestión de filamentos e hiperplasia interlamelar, a 4 mg/L se encontró de forma moderada dilatación del ápex lamelar, dilatación de la base lamelar, edema intercelular, pleomorfismo nuclear, cambio de la curvatura lamelar, hiperplasia interlamelar e hipersecreción epitelial, de forma severa aneurisma lamelar, congestión del filamento, hemorragias, fusión lamelar, depósitos intracelulares, ruptura de célula pilar, desprendimiento epitelial, atrofia lamelar, atrofia del filamento, necrosis, hipertrofia del epitelio interlamelar, hiperplasia epitelial del arco, hiperplasia de células de moco, respuesta inflamatoria e infiltración de leucocitos (Figura 6).

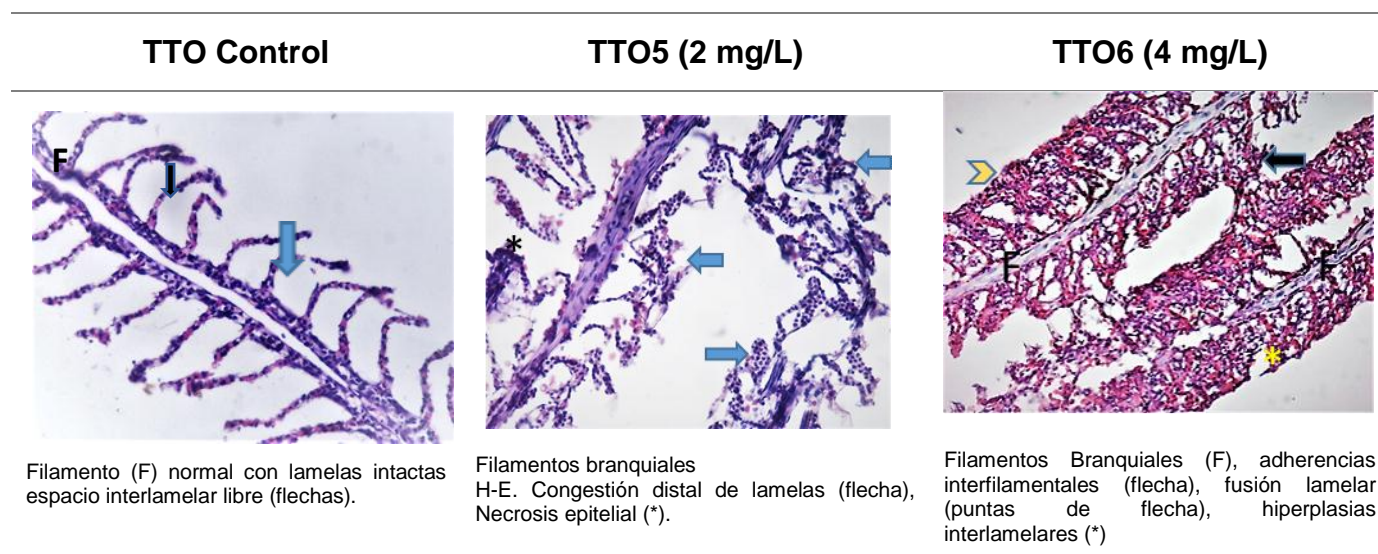


Figura 7. Branquias de individuos expuestos a POEA en TTO1 control, TTO5 (2 mg/L) presenta cambios degenerativos y fusión lamelar y TTO6 (4 mg/L) cambios hiperplásicos, fusión lamelar e infiltración de células inflamatorias. (40x. H&E).

Hígado: En el tratamiento control no se hallaron lesiones significativas, a concentraciones 0,2 y 0,5 mg/L leves cambios degenerativos y picnosis nuclear, a 1 mg/L leve necrosis multifocal de hepatocitos y de moderados cambios degenerativos, a 2 mg/L leve picnosis nuclear y de manera moderados cambios degenerativos (infiltración grasa) y alteraciones vasculares hemorrágicas, y a 4 mg/L de forma moderada necrosis multifocal de hepatocitos y severos cambios degenerativos (infiltración grasa) (Figura 7).

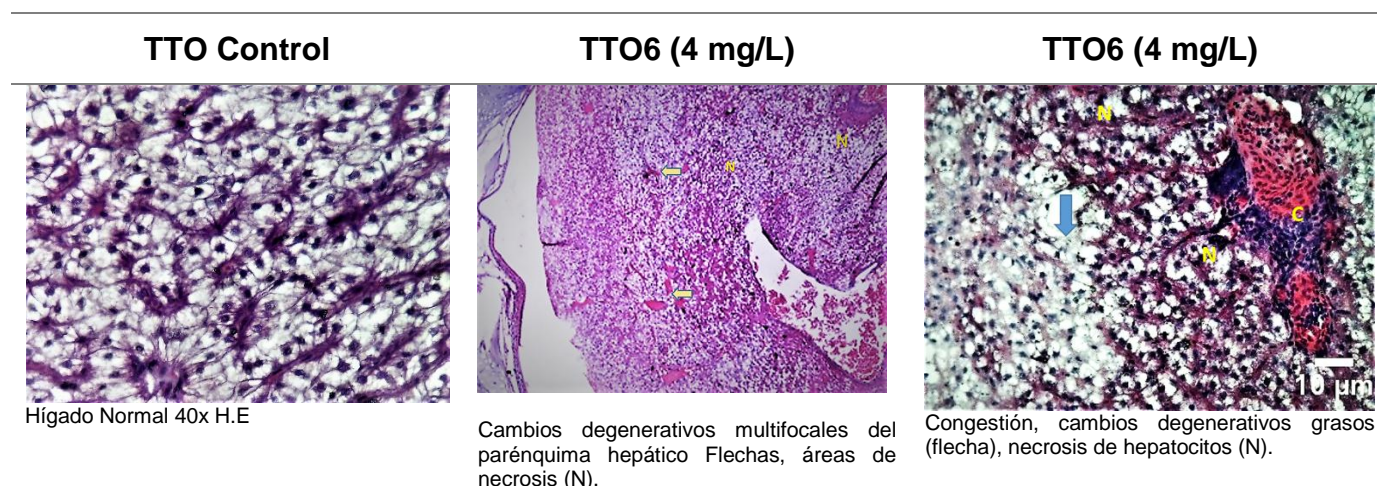


Figura 8. Hígado de individuos expuestos a POEA en TTO1 control (40x), TTO6 (4 mg/L) se presentan lesiones degenerativas multifocales (10x y 40x. H&E)

Telencéfalo: En el tratamiento control no se hallaron anormalidades, a concentraciones de 0,2 mg/L evidenció una leve infiltración CGE-Te y gliosis/satelitosis-Te, a 0,5 mg/L se manifestó una leve infiltración CGE-Te, a 1 mg/L se observó leve hemorragia de las meninges, necrosis/apoptosis de neuronas, moderada glicosis/ satelitosis-Te, a 2 mg/L se evidenció leve necrosis/apoptosis de neuronas, moderada gliosis/ satelitosis-Te y severa infiltración CGE-Te, a 4 mg/L fue evidente moderadas hemorragias de las meninges, severa infiltración CGE-Te, gliosis/ satelitosis-Te y necrosis/apoptosis de neuronas (Figura 8).

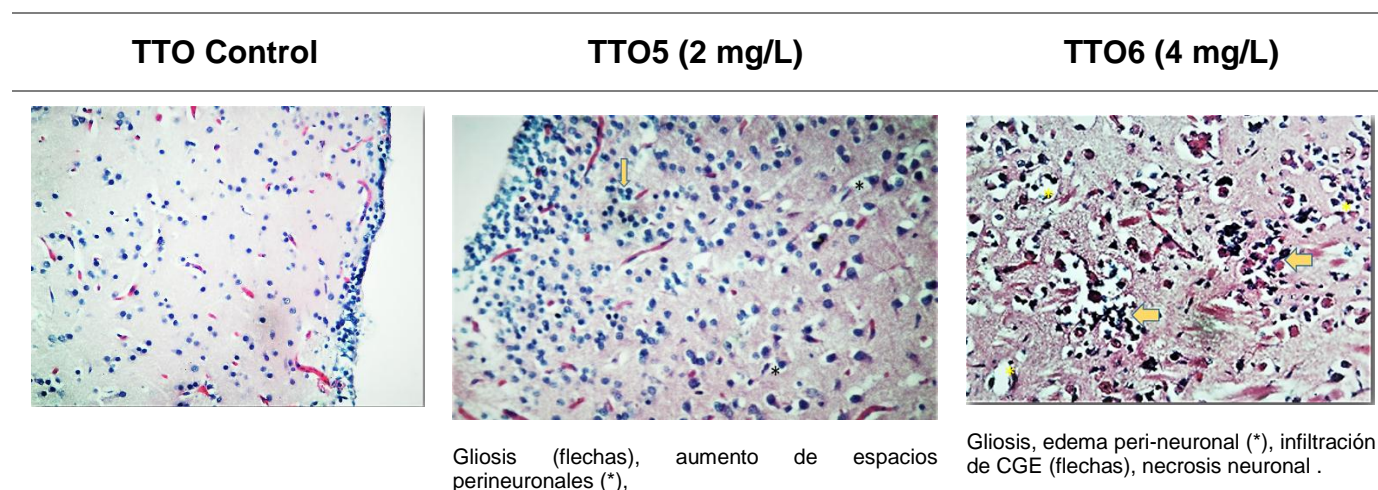


Figura 9. Telencéfalo de individuos expuestos a POEA en TTO1 control, TTO5 (2 mg/L) se presentan cambios micro-circulatorios y edema y TTO6 (4 mg/L) se presenta infiltración de mastocitos CGE/ CM (40x. H&E).

Diencéfalo: En el tratamiento control y a concentraciones de 0,2 mg/L no se encontraron daños significativos, a 0,5 mg/L se evidencio leve satelitosis, espongiosis /dilatación de espacios perivascuales, edemas al rededor del neurópilo, necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum, a 1 mg/L se halló leve necrosis en general y de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum, a 2 mg/L se manifestó moderada espongiosis /dilatación de espacios perivascuales y necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum y a 4 mg/L se encontró moderada satelitosis, severa espongiosis /dilatación de espacios perivascuales, edemas al rededor del neuropilo y necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum (Figura 9).

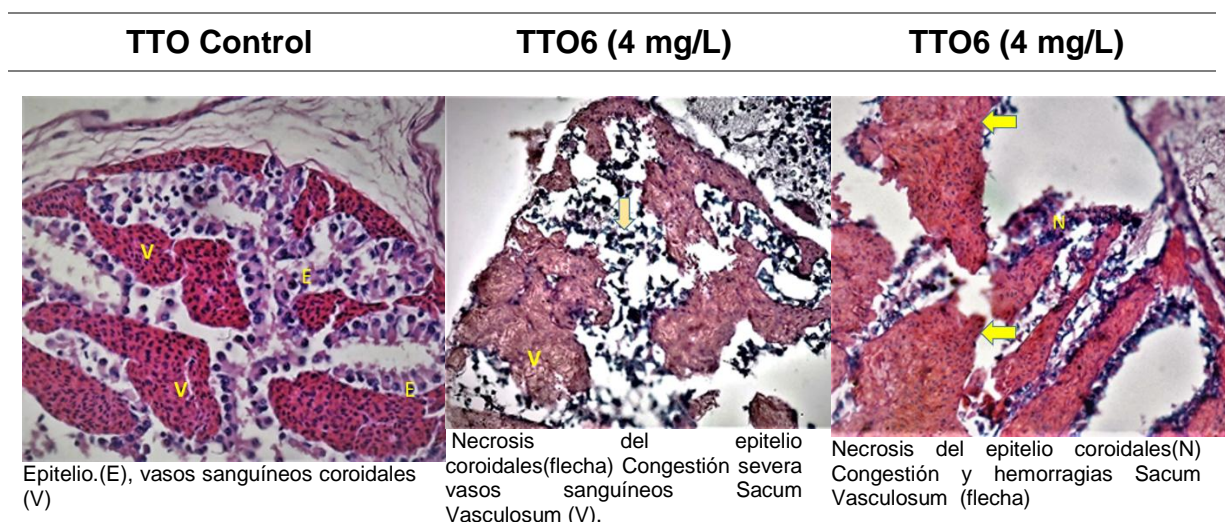


Figura 10. Sacum vasculosum de individuos expuestos a POEA en TTO1 control y TTO6 (4 mg/L) presentan necrosis del epitelio, congestión vascular severa y hemorragias del sacum vasculosum (40x. H&E)

Riñón Craneal: En el tratamiento control, concentraciones de 0,2 y 0,5 m/L no se hallaron lesiones significativas, a 1 mg/L se halló una leve hiperplasia del tejido glandular interrenal, y alteraciones vasculares /trombosis, a 2 mg/L se encontró leves alteraciones vasculares /trombosis, moderada hiperplasia del tejido glandular interrenal y necrosis glandular Interrenales, a 4 mg/L fue evidente una leve necrosis glandular interrenal, moderada hiperplasia del tejido glandular interrenal y alteraciones vasculares /trombosis (Figura 10).

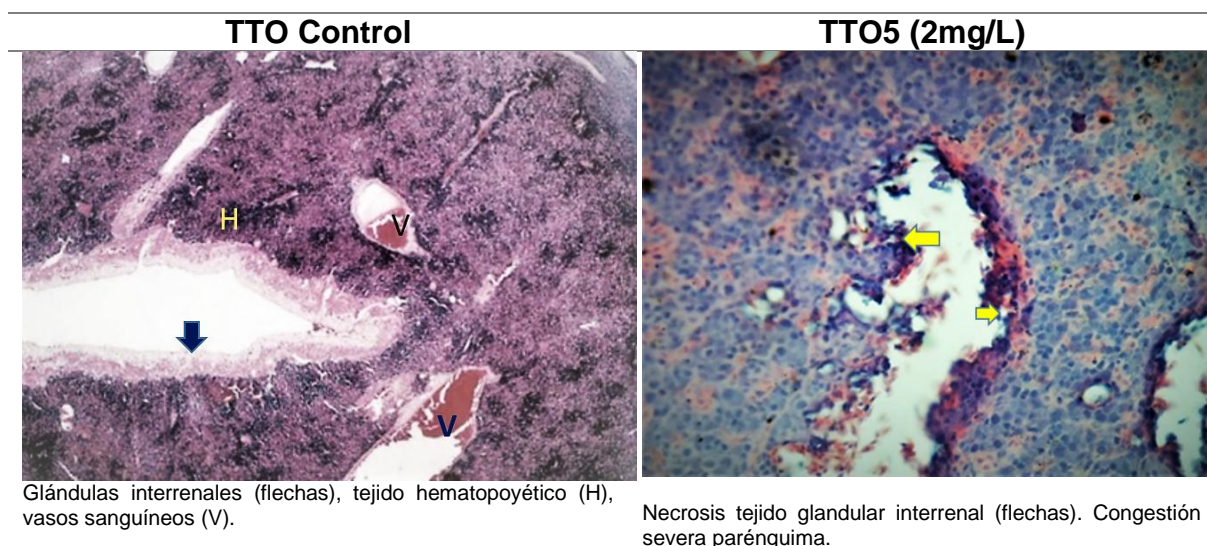


Figura 11. Riñón craneal de individuos expuestos a POEA en TTO1 control (10x) y TTO5 (2 mg/L) se presentaron lesiones necróticas en los tejidos granulares interrenales y congestión (40x. H&E).

Riñón posterior: En el tratamiento control no se presentaron alteraciones significativas, a concentraciones de 0,2 y 0,5 mg/L se evidenció una leve degeneración tubular y aumento de los CMM en parénquima, a 1 mg/L fue evidente el moderado aumento de CMM en parénquima y moderada degeneración tubular; a 2 mg/L presento leve inflamación intersticial, glomerulitis y degeneración glomerular, moderada degeneración y necrosis tubular, a 4 mg/L revela moderada degeneración glomerular e inflamación intersticial, evidenció lesiones severas como degeneración tubular, necrosis tubular, glomerulitis y aumento de CMM en parénquima. (Figura 11).

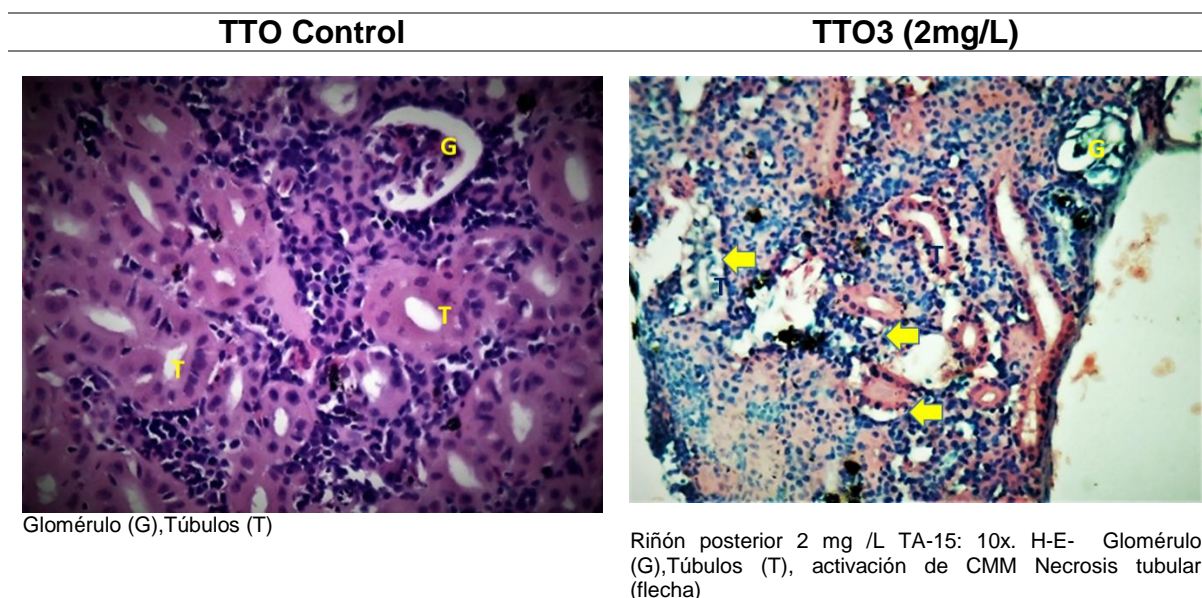


Figura 12. Riñón posterior de individuos expuestos a POEA en TTO1 control (0mg/L) y TTO3 (0,5 mg/L) se presentaron lesiones degenerativas tubulares severas y dilatación de la luz tubular (40x. H&E)

9.6 Efectos del CaCO_3

La toxicidad aguda de la exposición a POEA TA15 junto con el carbonato de calcio fue evaluada en condiciones controladas donde se observó que no hubo mortalidad de los peces en las concentraciones TTO1 (0 mg/L) y TT0 2 (CaCO_3 60 mg/L). No obstante, el TTO3 el cual contenía POEA en un valor de CL_{50} mostró una mortalidad del 50% (7/14) a las 38 horas de realizada la exposición y en el TTO 4 (CaCO_3 60 mg/L + POEA 2,1 mg/L) 9 individuos murieron en un transcurso de 20 horas de comenzado el ensayo.

Tabla 5. Mortalidad de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus* expuestos a 4 concentraciones de POEA y CaCO₃ durante 48 horas.n= 14

| Tiempo (h) | POEA TA15 + CaCO ₃ | | | |
|--------------|-------------------------------|--|-----------------------------|---|
| | TTO1 Control (0mg/L) | TTO 2 (CaCO ₃ 60mg/L) | TTO 3 (POEA 2,1 mg/L) | TTO 4 (CaCO ₃ 60mg/L + POEA 2,1mg/L) |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 18 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 7 | 9 |

9.7 Signos clínicos. En la identificación de los signos clínicos se halló que en los tratamientos control y 2 no se manifestaron signos relevantes, a partir del TTO3 (POEA 2,1mg/L) se presentó letargo a partir de las primeras 4 horas después de la exposición, pérdida de comportamiento gregario del cardumen y cambio del patrón de nado después de 8 horas , aumento de la frecuencia opercular y prolapso del labio inferior después de 10 horas, pérdida del eje de nado después de 11 horas y asenso de los individuos en la columna de agua a partir de las 11 horas. Por otro lado, en cambio en el TTO4 (CaCO₃ 60mg/L + POEA 2,1 mg/L) se presentó letargo a partir de las primeras 6 horas de iniciado el experimento, pérdida de la formación en cardumen después de 7 horas, cambio del patrón de

nado y ascenso de la mitad de los individuos en la posición de la columna de agua a las 9 horas, pérdida del eje de nado, nado errático y prolapso del labio inferior a las 11 horas y por último presentó angustia respiratoria después de 12 horas de exposición (Tabla 9).

Tabla 6. Signos clínicos en juveniles de cachama blanca expuestos a POEA TA15 y CaCO₃ en el transcurso de 48 horas

| TTO / Signos clínicos | Letargo | Pérdida de comportamiento grupal | Angustia respiratoria | Cambio en patrón de nado | Pérdida del eje de nado | Nado errático | Prolapso del labio inferior | Posición en la columna de agua |
|--|--|--|---|--|---|---|---|--|
| TTO 1 (0 mg/L) | | | | | | | | |
| TTO 2 (CaCO ₃ 60mg/L) | | | | | | | | |
| TTO 3 (POEA 2,1 mg/L) | x (a las 4 horas de iniciado el experimento) | x (a las 8 horas de iniciado el experimento) | x (a las 10 horas de iniciado el experimento) | x (a las 8 horas de iniciado el experimento) | x (A las 11 horas de iniciado el experimento) | x (a las 11.5 horas de iniciado el experimento) | x (a las 10 horas de iniciado el experimento) | Medio (a las 12 horas de iniciado el experimento) |
| TTO 4 (CaCO ₃ 60mg/L + POEA 2,1 mg/L) | x (a las 6hr de iniciado el experimento) | x (a las 7 horas de iniciado el experimento) | x (a las 12 horas de iniciado el experimento) | x (a las 9 horas de iniciado el experimento) | x (a las 11 horas de iniciado el experimento) | x (a las 11.5 horas de iniciado el experimento) | x (a las 11 horas de iniciado el experimento) | Superior/ Inferior (A las 9 horas de iniciado el experimento la mitad en la parte superior, la mitad en la parte inferior) |

9.8 Hallazgos de necropsia En los primeros dos primeros tratamientos, control y TTO2 no aparecieron anomalías evidentes, En el TTO3 se evidenció hemorragia en la piel, erosiones en aletas, cambio de coloración en branquias, congestión y hemorragia, congestión leve en boca, congestión en la meninges y leve aumento en líquido abdominal. Por otro lado, en el TTO4 se evidenciaron

leves erosiones en aletas, leve congestión en piel y las branquias presentaron coloración homogénea (Figura 12).




| TTO1 Control | TTO 2 (CaCO ₃ 60mg/L) | TTO 4 (CaCO ₃ 60mg/L/ POEA 2,1 mg/L) |
|---|--|--|
|  |  |  |
| Individuo con integridad de los órganos a las 48 h. | Individuo con integridad de los órganos, con piel saludable a las 48 h. | Individuo que presenta erosiones en aletas, leve congestión en piel y las branquias presentaron coloración homogénea a las 48 h. |

Figura 13. Hallazgos macroscópicos en individuos de cachama blanca expuestos a POEA TA15 y CaCO₃

10. DISCUSIÓN

El valor de la CL_{50} de POEA hallado en el primer experimento (2,08 mg/L) fue similar a reportado por Folmar *et al.* (1979) quienes trabajaron con Trucha arcoíris *Salmo gairdneri* (*Oncorhynchus mykiss*) (2 mg/L) e inferior al hallado por Brausch y Smith (2007) con Salmón rojo *Oncorhynchus nerka* (2,6 mg/L). Así mismo se relacionó esta información con la CL_{50} de diferentes surfactantes, trabajos como los de Buhl & Hamilton, (2000) que expusieron juveniles de trucha arcoiris a Alquilbenceno sulfonado lineal (LAS) con longitud promedio de la cadena alquil $C_{11, 4}$ obteniendo como resultado CL_{50} (5 mg/L), también trabajó con Dodecil sulfato sódico (SDS) obteniendo una CL_{50} de (24,9 mg/L) lo cual está muy por encima del resultado del presente trabajo. Además, Krogh *et al.*, (2003) determinaron el valor de CL_{50} de alcoholes etoxilados en salmón *Salmon salar* L. de 1,5 mg/L y de alquil-aminas etoxiladas obteniendo una CL_{50} de 0,09-0,78 mg/L, los cuales están por debajo de lo hallado en el presente estudio. Al confrontar esta información examinamos que los compuestos aniónicos LAS y SDS presentaron CL_{50} altas por el contrario los compuestos no iónicos revelaron CL_{50} bajas, esto implica que los últimos son más tóxicos.

Los juveniles de cachama blanca expuestos a concentraciones de 1, 2 y 4 mg/L de POEA TA15 evidenciaron signos de intoxicación, tales como lesiones erosivas en piel y aletas los cuales fueron más severos en las concentraciones más altas. Los cambios en el comportamiento como letargo, pérdida de comportamiento gregario de cardumen y angustia respiratoria, aunque bajo las dos últimas concentraciones (2 y 4 mg/L) además de manifestar la sintomatología ya descrita, también se presentó la pérdida del eje de nado, el nado errático, el prolapso del labio inferior y

finalmente el cambio de posición hacia la parte superior de la columna de agua. Dichos cambios comportamentales son descritos en trabajos de Lewis, (1991) con pececillo cabezón *Pimephales promelas*, también estos signos también se han descrito en trabajos como el de Navarro, y Martinez, (2014) con bocachico *Prochilodus lineatus*. Descripciones similares se hallaron en otros estudios de toxicidad como en hidrocarburos clorados Omitoyin *et al.* (2006) con *Clarias gariepinus*, ensayos con Roundup® en *Piaractus brachypomus* por Ramírez *et al.* (2004) y mezcla de herbicidas Roundup® y Cosmoflux® 411F por Ramírez *et al.* (2009). Este tipo de alteraciones del comportamiento se pueden deber a daños en el sistema nervioso central (Nivia, 2000; Peña y Carter, 2001).

Se hallaron lesiones importantes en piel y aletas en los grupos expuestos a 2 y 4mg/L de POEA TA15, (Figura 4) sugieren que el compuesto puede ser corrosivo para los peces como ha sido propuesto por Abel & Skidmore, (1975). Los hallazgos histopatológicos branquiales, renales, hepáticos y cerebrales son similares a los descritos por Ramírez-Duarte *et al.*, (2006) y Rondón-Barragán *et al.* (2007).

En cuanto a las alteraciones histopatológicas en la piel se evidenció que a concentraciones de 2 mg/L y 4 mg/L aparece moderada hiperplasia/hipertrofia de células epiteliales de alarma de la epidermis y erosiones en epidermis, puesto que los surfactantes tienen la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana celular, alterando el componente lipídico de células de alarma, epiteliales y de moco (Abel & Skidmore, 1975; Bols *et al.*, 2001 y Rondón-Barragán *et al.*, 2007). De la misma manera en individuos expuestos a 4mg/L aparecieron úlceras y hemorragias que fueron generadas por que paulatinamente las células pilar se

hallaron laxas y generaron apoptosis como es descrito por Rondón-Barragán *et al.*, (2007).

En branquias se halló hiperplasia del epitelio interlamelar y del arco branquial, atrofia lamelar, del mismo modo fusión lamelar; esta clase de lesiones afirman el tipo de respuestas comunes ante el daño branquial Noga (2000); casualmente el epitelio puede llegar a un desprendimiento y la estructura lamelar perder su conformación y anonadamiento. De la misma manera esta clase de exposición a tóxicos puede ocasionar una pronta destrucción lamelar en un corto lapso de tiempo (Heath, 1995).

También reveló hiperplasia de las células de moco las cuales aparecen como forma de estrategia para evitar una mayor distribución del agente tóxico, además es como un mecanismo compensatorio a la probable alteración de electrolitos (Lin y Randall 1995). La fusión lamelar, desprendimiento epitelial y edema intercelular son lesiones que están directamente relacionadas con el hecho de ser una respuesta de adaptación que protege la homeostasis electrolítica. (Mallatt, 1985). Las hemorragias y aneurismas observadas en los peces expuestos a POEA probablemente están asociados a la capacidad irritante que tiene este surfactante (Roberts y Rodger, 2001); Además, la exposición causó hiperplasia epitelial branquial y generó necrosis lo que redujo la permeabilidad del oxígeno, provocando un deterioro de la función respiratoria y la pérdida sus funciones en consecuencia produciendo hipoxia (Peña y Carter, 2001; Messaad y Al Zailaie, 2017). Lesiones similares han sido descritas ante el uso de organofosforados en pez cachorro árabe *Aphanius dispar* por Ba-Omar y Al-Jardani, (2011).

Se presentaron alteraciones en el hígado en animales expuestos a POEA e incluyeron cambios degenerativos de moderados a severos en la concentración más alta. También se halló necrosis multifocal de hepatocitos las cuales se asemejan a las alteraciones en hepatocitos descritas por Szarek *et al.*, (2000), quienes trabajaron con Roundup® en carpa *Cyprinus carpio*. Así mismo se presentó en el tratamiento 5 leve picnosis nuclear, probablemente una muerte celular por apoptosis (Rojas, *et al.*, 2013).

En cuanto al telencéfalo se presentó en el tratamiento 5 leve necrosis/apoptosis de neuronas, moderada gliosis/satelitosis-Te y severa infiltración CGE-Te similares a las descritas por Rondón-Barragán *et al.*, (2007) cuyo trabajo fue en individuos de la misma especie, pero utilizando el surfactante Cosmoflux 411f. En el tratamiento 6 se hallaron estas mismas lesiones, pero de mayor severidad acompañadas de hemorragias moderadas en las meninges, similares a lo evidenciado por Rondón-Barragán *et al.* (2007) También se presentó necrosis/apoptosis de neuronas lo cual ha sido reportado en otros estudios (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008). Además, fue evidente infiltración de lesiones por células granulares eosinofílicas CGE en los tratamientos de mayor concentración con alteraciones severas en el sistema de líquido cefalorraquídeo (figura 8), y en el diencéfalo se reporta espongiosis, edemas alrededor del neuropilo, se hallaron zonas de muerte neuronal y necrosis en cuerpos coroideos// *Sacum vasculosum* (figura 9). Los daños reportados generan como resultado una posible alteración y cambios en el comportamiento grupal como los manifestos en el cuadro de signos clínicos (tabla 6) similar a lo

reportado por Rondón-Barragán *et al.* (2007). Es muy importante considerar que es la primera vez que se realiza una descripción de estas lesiones en el sistema nervioso central provocadas por la exposición de POEA en peces, sin embargo, ya existen reportes de lesiones con Roundup® (Ramírez *et al.*, 2004; Ramírez-Duarte *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2008); Cosmoflux® 411f (Ramírez *et al.*, 2009; Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

En el riñón se observó glomerulitis, degeneración tubular, necrosis, aumento de CMM en parénquima similares a los reportes hechos por Ramírez *et al.*, (2009).

En el segundo ensayo donde se evaluó la interacción del POEA a concentración de CL₅₀ y se hallaron porcentajes de mortalidad de 0% en el tratamiento control (0 mg/L) y 2 (CaCO₃ 60 mg/L), 50% de mortalidad en el tratamiento 3 POEA (2,1 mg/L) en 38 horas de exposición, corroborando de esta manera lo encontrado en el primer ensayo (figura 2) y 64,2% de mortalidad en el tratamiento 4 (CaCO₃ 60 mg/L + POEA 2,1 mg/L) a las 24 horas de empezada la exposición (Tabla 7); se evidenció que el POEA no presentó afinidad por los sedimentos (CaCO₃) como se esperaba; Rodríguez-Gil *et al.*, (2016), Wang *et al.* (2005) sugieren que organismos asociados a medios acuáticos de sistemas lenticos con presencia de sedimentos tienen menores probabilidades de verse afectados al POEA. Por el contrario, el POEA aumentó la toxicidad, esta condición corresponde al cambio de este surfactante de ser un compuesto catiónico a pH neutro y ácido, al volverse no iónico en pH alcalino (Tsui & Chu, 2003).

Con respecto a los signos clínicos en el tratamiento 3 aparecieron a partir de las 4 horas de comenzado el mismo, así mismo en el tratamiento 4 aparecieron a partir de las 6 horas de iniciado, los primeros descensos en el tratamiento 3 ocurrieron a las 12 horas desde la exposición y la mitad de los individuos perecieron a las 38 horas, de la misma manera en el tratamiento 4 los primeros descensos se obtuvieron a la hora de iniciada la exposición y a las 9 horas la mitad de los individuos perecieron.

El surfactante No Iónico POEA-TA15 es un compuesto altamente tóxico para la cachama blanca, produce mortalidad y lesiones severas en piel, aletas, branquias, hígado, telencéfalo, riñón, entre otros órganos. Este tipo de surfactante no ionizado hace parte de formulaciones comerciales de herbicidas a base de glifosato usadas en Colombia. Así mismo, se observó que la interacción entre el POEA y aCO3 a dosis de 60 mg/L no es favorable para evitar signos y las lesiones asociadas al surfactante.

En 2016 la Comisión Europea recomendó prohibir el uso de mezclas con POEA, según reglamento de ejecución de la comisión europea (UE) 2016/1313, recomendando retirar del uso productos fitosanitarios a base de glifosato que contengan el coformulante tallowamina polietoxilada (n.o CAS 61791-26-2), dicho reglamento fue modificado por los estudios de toxicología vinculados con el POEA ejecutados por la Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), eur-lex.europa.eu (2016). Por estas razones, en nuestro medio se sugiere el uso responsable de esta clase de sustancias en entornos acuáticos o próximos a ellos

y la trascendencia de instaurar y mejorar normativas sobre el empleo de sustancias asociadas al glifosato y demás químicos vinculados al agro.

11. CONCLUSIONES

- La CL₅₀ a 96 horas del POEA TA15 en juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus* fue de 2,08 mg/L, con un intervalo de confianza del 95% (1,799-2,405).
- Los individuos expuestos a POEA (TA-15) mostraron signos de letargo, desagrupamiento, angustia respiratoria, cambios en el patrón y eje de nado, prolapso del labio inferior y elevación con respecto a la columna de agua, reflejando señales de intoxicación desde concentraciones de POEA de 1 mg/L.
- Los individuos expuestos al POEA TA15 revelaron lesiones a nivel macroscópico principalmente cambios de coloración en la piel, erosiones en piel y aletas, hemorragia en boca y arcos branquiales, hemorragias petequiales en piel, aumento del líquido de la cavidad celómica y hemorragias severas en meninges.
- Se presentaron lesiones severas en piel, branquias, hígado, telencéfalo, diencéfalo y riñón en las concentraciones de 2 mg/L y 4 mg/L de POEA-TA15, por tanto, es un compuesto que por sí solo es más irritante que las mezclas comerciales como el Roundup® en cachama blanca.
- La interacción entre el POEA-TA15 y CaCO₃ no es favorable para evitar la mortalidad y lesiones en peces.
- Dado que esta clase de sustancias no son controladas por la legislación Colombiana y al encontrar una CL₅₀ tan baja, considerando los efectos

altamente tóxicos del POEA para cachama blanca, así como las acciones tomadas por la Unión Europea en 2016, es importante que las autoridades y organismos de control ambiental colombianos aborden la **revisión de las licencias** de las mezclas comerciales disponibles ante las expectativas de un mayor uso de herbicidas frente al desarrollo agrícola actual de los Llanos.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abel P. D. y Skidmore JF. (1975). Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. Wat Res; 9:759-765.

Álvarez, M., Gimenez, I. T., Saitua, H., Enriz, R. D., & Giannini, F. A. (2012). Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. Acta toxicológica argentina, 20(1), 5-13

Arcos, A. B., & Figueroa, M. A. I. (2007). Toxicidad del glifosato en peces como indicadores biológicos, y análisis de sus efectos sobre el ambiente y la salud humana. Sección artículos originales, 16.

Ardila, G. A. (2009). Efectos del glifosato sobre la ganancia de peso y el crecimiento en alevinos de Yamú, Brycon Amazonicus.

Argüello-Rangel, J., Triana-García, P. A., & Eslava-Mocha, P. R. (2015). Células Granulares Eosinofílicas/Células Mast (CGE/MC) y su relación con los efectos de herbicidas: Caso del Glifosato y surfactantes acompañantes en peces. *Orinoquia*, 19(1), 59-76.

Arias, J. (1988). Apuntes sobre el cultivo de la cachama en el Meta. *Agrometa*, 20, 9-10.

Ba-Omar, T. A., Al-Jardani, S., & Victor, R. (2011). Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*, 43(1), 29-38.

Baptiste, G. (2006). Utilizar. In H. Correa, S. L. Ruiz, & L. M. Arevalo (Eds.), *Plan de Acción en Biodiversidad de la Cuenca del Orinoco, Colombia 2005e2015* (pp. 330).

Bogotá: Instituto de Investigaciones en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Benachour, N., & Séralini, G. E. (2008). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical research in toxicology*, 22(1), 97-105.

Birch, M. D. (1977). Toxicity Studies on POEA. Unpublished report, Younger Laboratories, Inc., St. Louis, MO

Bols N. C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* ; 25: 853-873.

Brausch, J. M., & Smith, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 52(2), 217-221.

Buhl, K., Hamilton, S. (2000). Acute toxicity to fire-control chemicals, nitrogenous chemicals, and surfactants to rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. 129: 408-418. 14. BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., MEIER, W. 2000. Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 46:34-40.

Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., ... & Cuevas, A. G. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*, 429, 2-35.

Carter, A. (1994). Using the Spearman–Karber method to estimate the ED50. In *SAS Conference Proceedings, Dallas-USA* (pp. 1120-1225).

Diamond G y Durkin, P. (1997). Effects of surfactants on the toxicity of glyphosate, with specific reference to rodeo. Prepared under USMA FS Contract No. 53-3187-5-12. Final Report. February 6, 1997.

Díaz, F., y López, R. (1993). El cultivo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomum*). Fundamentos de Acuicultura Continental. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá, Colombia. p, 207-219.

Ducar, J., Tredaway., Macdonald, G. (2003). Adjuvants. Series of Agronomy Department, University of Florida. Abril, 5 p

El país. (11 enero 2017) Colombia inició fumigación manual con glifosato contra cultivos de coca. Recuperado de: <http://www.elpais.com.co/colombia/inicio-fumigacion-manual-con-glifosato-contra-cultivos-de-coca.html>

Eslava-Mocha, P. R., Ramírez-Duarte, W. F., & Rondón-Barragán, I. S. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Universidad de los Llanos. Colombia.

Eur-lex.europa.eu. (2016). EUR-Lex - 32016R1141 - EN - EUR-Lex. [online] Available at:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32016R1141>
[Accessed 17 May. 2018].

Fernícola, N. A. (1985). Toxicología de los insecticidas organoclorados. Bol. Of. San Panam. 98(1): 10 – 18.

Folmar, L. C., Sanders, H. O. & Julin, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 8, 269-278.

Foy, C. L., & Pritchard, D. W. (1996). Pesticide formulation and adjuvant technology. CRC press.

Gamboa Gutiérrez. (1998- 2002). “Ni una sola mata de coca”: Las políticas de erradicación de cultivos ilícitos en Colombia. Facultad de ciencias Humanas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Giesy, J. P., Dobson, S. Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167, 35-120.

Granda, M. N. M., & Aguirre, M. B. (2016). La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20(1), 79-86.

González-Torralva, F., Pérez-López, M., & De Prado, R. (2013). Resistencia A Glifosato: Aspectos Biológicos Y Agronómicos. Viabilidad Del Glifosato En Sistemas Productivos Sustentables.

Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7), 714-719.

Harte J., Holdren C., Schneider R., Shirley C. (1991). Guía de las sustancias contaminantes. En: El libro de los tóxicos de la A a la Z. Ed. Grijalbo, Argentina, 642 pp.

Heath A. (1995). Water pollution and fish physiology. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton.

Henao Muñoz, L. M. (2014). Toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada del Glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-flux® 411F en renacuajos de anuros colombianos.

Henao Muñoz, L. M., Triana Velásquez, T. M., & Bernal Bautista, M. H. (2015). Toxicity Assesment of Two Agrochemicals, Roundup® Active and Cosmo-Flux® 411F, to Colombian Anuran Tadpoles. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 153-161.

Hernández A. (1994). Estado actual del cultivo de *Colossoma* y *Piaractus* en Brasil, Colombia, Panamá, Perú y Venezuela. Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura y V Seminario Nacional de Acuicultura, Acuicultura y Desarrollo Sostenible. Santafé de Bogotá, p. 9–23.

Howe C. M., Berrill M., Pauli D.B., Helbing C.C., Werr K., Veldhoen N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem* 23:1928–1938.

IARC, (2015). International Agency for Research on Cancer Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC Working Group. Lyon;3-10 March 201. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum.

Justicia, (5 mayo 2016). Reanudar uso de glifosato es una contradicción del Gobierno: Ordoñez. *El Tiempo*.

<http://www.eltiempo.com/politica/justicia/procurador-dice-que-reanudar-uso-del-glifosato-es-una-contradiccion-del-gobierno/16582933>

Krogh. K., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B. & Vejrup, K. (2003). Environmental properties and effects of nonionicsurfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*. 50: 871-901.

Lankem.eu. (2018). [online] Available at: <http://www.lankem.eu/assets/lansurf-ta15-tds-en.pdf> [Accessed 5 Mayo 2018].

Lewis M. A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Res*; 25: 101-113.

Lin H. y Randall D. (1995). Proton pumps in fish gills, p.229-255. In: Hoar W.S., Randall D.J. & Farrell A.P. (Ed.), *Fish Physiology: cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. Academic Press, New York. 388p.

Luna, L.G. (1968). *Manual histologic staining methods of the Armed Forces*. Institute of Pathology. Mc Graw, Nueva York. 258 p.

Maldonado-Campo, J. A., Bogotá-Gregory, J. D., & Usma, J. S. (2009). Peces. In M. H. Romero, J. A. Maldonado-Campo, J. D. Bogotá-Gregory, J. S. Usma, A. M. Umaña-Villaveces, J. I. Murillo, S. Restrepo-Calle, M. Álvarez, M. T. Palacios-

Lozano, M. S. Valbuena, S. L. Mejía, J. Aldana-Domínguez, & E. Payán (Eds.), *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2007e2008: piedemonte orinoquense, sabanas y bosques asociados al norte del río Guaviare* (pp.151). Bogotá D.C., Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Mallatt J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can J Fish Aquat Sci*; 42: 630-648.

Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G. & Belle R. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 326–331

Martínez T.T. & Brown K. (1991). Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 34: 43–46

Messaad, I. A., & Al Zailaie, K. A. (2017). Evaluation of Glyphosate Toxicity on Arabian killifish, *Aphanius dispar* Collected from Southwestern Saudi Arabia.

Mottier, A., Pini, J., & Costil, K. (2014). Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *The Journal of toxicological sciences*, 39(2), 211-215.

Navarro, C. D., & Martínez, C. B. (2014). Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 165, 83-90.

Navarro, O. J., Velasco Santamaría, Y. M., & Cruz Casallas, P. E. (2004). Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama

blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(4).

Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (1997). Conventional agricultural development models and the persistence of the pesticide treadmill in Latin America. *The International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 4(2), 93-111.

Nivia, E. (2000). Impacto de la Fumigaciones en Zonas de cultivos Ilícitos; En: Castañeda, D.; M. Castro; A. Medina y M. E. Bernal. *Cultivos Ilícitos en Colombia. Memorias del Foro realizado el 17 y 18 de agosto de 2000*, Universidad de los Andes. Ediciones Uniandes. Bogotá. pp. 133-141.

Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J., & Blust, R. (2011). Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PLoS One*, 6(11), e24139.

Noga J. (2000). *Fish disease. Diagnosis and treatment*. USA: Iowa State University Press. 497 p.

O'melia, C. R. (1989). Particle—particle interactions in aquatic systems. *Colloids and surfaces*, 39(1), 255-271.

Omitoyin, B. O. (2006). Haematological changes in the blood of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juveniles fed poultry litter. *Livestock research for rural development*, 18(11), 200.

OMS (Organización Mundial de la Salud), 1994. El glifosato: criterios de salud ambiental 159. Ginebra.

Onil, S. (2001). Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Organización Panamericana de Salud. Instituto Nacional de salud pública de Quebec.

Ostera, J. M., Malanga, G., & Puntarulo, S. (2016). Actualización sobre aspectos oxidativos del efecto del glifosato en sistemas biológicos/ An update on the effects of glyphosate on the oxidative state in biological systems. *biotecnia*, 18(2), 3-10.

Peña, C., & Carter, D. (2001). *Toxicología Ambiental, Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*, The University of Arizona.

Ramírez-Duarte, W. F., Rondón-Barragán, I. S., Vidal, H. H., & Eslava-Mocha, P. R. (2004). Toxicidad del Roundup® en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), concentración letal 50, observaciones clínicas y lesiones asociadas. In *Memorias del II Congreso Colombiano de Acuicultura, X Jornada de Acuicultura IALL: Retos frente a la globalización de mercados* (pp. 27-29).

Ramírez-Duarte, W. F., Rondón-Barragán, I. S., & Eslava-Mocha, P. R. (2005) Surfactantes asociados a herbicidas: Efectos sobre organismos acuáticos. 9(2)

Ramírez-Duarte, W. F. (2006). Evaluación anatomopatológica de los efectos tóxicos agudos del Roundup® en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). [Trabajo de grado] Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias y recursos naturales; 2006.Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta, Colombia.

Ramírez-Duarte W.F., Rondón-Barragan I.S., Eslava-Mocha P.R. (2008). Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq Vet Bras.*;28(11):547-554

Ramírez, D., Rondón, B., Vidal, B., & Eslava, M. (2009). Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411f. *Revista MVZ Córdoba*, 14(1), 1563-1575.

Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75

Rankine, B. B. (2015). Examination of the Environmental Fate and Effects of POEA in Shallow Freshwater Ecosystems (Doctoral dissertation, The University of Manitoba).

Relyea R.A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15:1118–1124.

Roberts R.J. & Rodger H.D. (2001). The pathophysiology and systematic pathology of teleost, 55-132. In: Roberts R.J. (Ed.), *Fish Pathology*. 3rd ed. W.B. Saunders, London.

Rodriguez-Gil, J. L., Lissemore, L., Solomon, K., & Hanson, M. (2016). Dissipation of a commercial mixture of polyoxyethylene amine surfactants in aquatic outdoor microcosms: Effect of water depth and sediment organic carbon. *Science of the Total Environment*, 550, 449-458.

Rojas, L. M., Mata, C., Oliveros, A., & Salazar-Lugo, R. (2013). Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas. *Revista de Biología Tropical*, 61(2).

Romero-Ruiz, M. H., Flantua, S. G. A., Tansey, K., & Berrio, J. C. (2012). Landscape transformations in savannas of northern South America: Land use/cover changes since 1987 in the Llanos Orientales of Colombia. *Applied Geography*, 32(2), 766-776.

Rondón-Barragán, I. S., Ramírez-Duarte, W. F., & Eslava-Mocha, P. R. (2007). Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20(4).

Ross, A. R., & Liao, X. (2015). A novel method for the rapid determination of polyethoxylated tallow amine surfactants in water and sediment using large volume injection with high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Analytica chimica acta, 889, 147-155.

Ruiz-Toledo, J., & Sánchez-Guillén, D. (2014). Efecto de la concentración de glifosato presente en cuerpos de agua cercanos a campos de soya transgénica sobre la abeja *Apis mellifera* y la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula*. Acta zoológica mexicana, 30(2), 408-413.

Salazar-López, N. J., & Madrid, M. L. A. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. Biotecnia, 13(2), 23-28.

Salazar N. y Aldana M. (2011). Glyphosate herbicide: uses, toxicity and regulation. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Mexico. 31: 117–165.

Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G., & Ronco, A. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. CIID, Ottawa, ON, CA.

Serrano, S. H. (2016). Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2016. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Bogotá DC, Boletín Técnico No. 00.02. 97. 13

Servizi, J. A., Gordon, R. W., & Martens, D. W. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 39(1), 15-22.

Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, E. J. P., & Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 43-125). Springer New York.

Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., & Banaszkiewicz, T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine environmental research*, 50(1-5), 263-266.

Tsui, M. T., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197.

Tu, M., y Randall, J. (2003). Chapter 8—Adjuvants. *Weed Control Methods Handbook*, The Nature Conservancy.

Tush, D., Loftin, K. A., & Meyer, M. T. (2013). Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1319, 80-87.

Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., & Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*, 29(3).

Vera, M. S. (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Wang, N., Besser, J. M., Buckler, D. R., Honegger, J. L., Ingersoll, C. G., Johnson, B. T., ... & McKee, M. J. (2005). Influence of sediment on the fate and toxicity of a

polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59(4), 545-551.

Wehtje, G. and R.H. Walker, 1997. Interaction of glyphosate and 2,4-D for the control of selected morninglory (*Ipomoea* spp.) species. *Weed Technology* 11: 152-156.

Williams, G.M., Kroes, R., Munco, C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans. *Regul. Toxicology. Pharm.* 31, 17-65.

Witt, J. (1998). Agricultural Sprayadjuvants Extension Chemist and Toxicologist Oregon State University. 5123 Comstock Hall Cornell University Ithaca, New York. Last Modified:05/08/1998 © 2002 Cornell University- on-line

Yanong R. (2003). Necropsy Techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*.13(2): 89-105.

CAPITULO 2

EFFECTO DEL POLIOXI-ETANOL-AMINA (POEA) Y CaCO_3 EN *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)

Vargas-Pulido AL1, León-Pinzón AL1, Eslava-Mocha PR1* Velasco-Santamaría YM2
1 Grupo de investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos / Doctorado en
Ciencias Agrarias, Unillanos. [*pedro.eslava@unillanos.edu.co](mailto:pedro.eslava@unillanos.edu.co) ; ** 2 Grupo de
Investigación en Biotecnología y Toxicología Acuática y Ambiental – BioTox, Escuela
de Ciencias Animales, Unillanos

RESUMEN

Los herbicidas a base de glifosato son muy usados para control de malezas en cultivos agrícolas tradicionales y modificados genéticamente, y también en la erradicación de cultivos ilícitos; generándose variedad de efectos tóxicos de estas formulaciones comerciales en especies no blanco como, peces, anfibios y seres humanos. Mezclas comerciales de glifosato se asocian con adyuvantes, tales como los surfactantes no-iónicos, alquil-aminas polietoxiladas (POEA), que potencian la toxicidad del herbicida, pero son considerados inertes para propósitos regulatorios. Se efectuó un ensayo para determinar CL_{50} con TA15, exponiendo juveniles (5.1 ± 1.2 gr peso, 5.9 cm LE) de *Piaractus brachypomus* a 6 tratamientos así: T1=0 mg/L, T2=0.2 mg/L, T3=0.5 mg/L, T4=1 mg/L, T5=2 mg/L y T6=4 mg/L durante un periodo de 96 h, 8 animales por acuario, en acuarios de 50 L con 3 réplicas y un segundo ensayo exponiendo juveniles (5 g peso y 5,9 cm LE) a CL_{50} de POEA y CaCO_3 en 4 tratamientos así: T1=0 mg/L, T2= CaCO_3 60 mg/L, T3=POEA 2.1 mg/L, T4= POEA 2,1 mg/L / CaCO_3 60 mg/L durante un periodo de 48 h, 8 individuos en acuarios de 50 L con 2 réplicas. En los ensayos se mantuvieron parámetros físico-químicos del agua (T° , O_2 , pH, conductividad) adecuados para la especie y se registraron signos clínicos (letargia, disgregación, posición en columna de agua, pérdida del eje de nado y angustia respiratoria), lesiones externas (erosión, aletas y piel), mortalidad, hallazgos en la necropsia macroscópicos y microscópicos para cada tratamiento. La CL_{50} para TA15

calculada fue de 2.08 mg/L lo cual implica que es un compuesto altamente tóxico para peces, produce mortalidad y lesiones; esta sustancia hace parte de formulaciones comerciales de herbicidas a base de glifosato y actualmente se encuentra prohibido, según reglamento de ejecución de la comisión europea (UE). El CaCO_3 no fue efectivo para disminuir la mortalidad de animales expuestos.

Palabras clave: *Surfactante, POEA, Herbicidas, Toxicidad aguda, Piaractus brachypomus.*

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides are widely used to control weeds in traditional and genetically modified agricultural crops, and also in the eradication of illicit crops; finding a variety of toxic effects of these commercial formulations in non-white species such as fish, amphibians and humans. Commercial mixtures of glyphosate are associated with adjuvants, such as non-ionic surfactants, polyethoxylated alkyl amines (POEA), which enhance the toxicity of the herbicide, but are considered inert for regulatory purposes. A test was performed to determine LC₅₀ with TA15, exposing juveniles (5.1 ± 1.2 g weight, 5.9 cm LE) of *Piaractus brachypomus* juveniles (5.1±1.2 g weight, 5.9 cm LE) to six treatments: T1=0mg/L, T2=0.2mg/L, T3=0.5mg/L, T4=1mg/L, T5=2mg/L and T6=4mg/L during a period of 96h, 8 animals per recipient, in aquariums of 50L with 3 replicas. And another essay exposing the juveniles (5g weight, 5.9 cm LE) to POEA CL₅₀ and CaCO_3 in 4 treatments as follow: T1=0mg/L, T2= CaCO_3 60mg/L, T3= POEA 2.1 mg/L, and T4= POEA 2,1mg/L / CaCO_3 60mg/L, during a 96h period, 8 animals per recipient, in aquariums of 50L with 2 replicas. During all essays the physic–chemical parameters (T °, O₂, pH, conductivity) suitable for the species were maintained and clinical signs were recorded (lethargy, disintegration, position in the water column, loss of the swim axis and respiratory distress) , external injuries (erosion, fins and skin), mortality, macroscopic and microscopic necropsy findings for each treatment. The LC₅₀ for TA15 calculated was 2.08 mg / L which implies that it is a

highly toxic compound for fish, it produces mortality and injuries; This substance is part of commercial formulations of glyphosate-based herbicides and is currently prohibited, according to the European Commission (EU) implementing regulations. CaCO₃ was not effective in reducing the mortality of exposed animals.

Keywords: *Surfactant, POEA, Herbicides, Acute toxicity, Piaractus brachipomus.*

INTRODUCCIÓN

En Colombia son de uso común los agroquímicos y plaguicidas para el mantenimiento de cultivos, algunos herbicidas tales como el glifosato y sus mezclas se implementaron en el país con la política de erradicación de cultivos ilícitos (Nivia, 2000) y en los últimos años se ha incrementado el uso de estas sustancias xenobióticas en monocultivos agroindustriales tales como la soya, el arroz y la palma de aceite, también en silvicultura y manejo de zonas verdes en áreas urbanas (Argüello-Rangel, *et al.*, 2015; Serrano, 2016); además ha contaminado la vegetación y los humedales. La Orinoquia abarca más del 50% de los humedales de Colombia, comprendiendo más del 40% de los peces del país. (Maldonado-Campo *et al.*, 2009).

Estudios toxicológicos han determinado el papel de las sustancias acompañantes como los surfactantes y adyuvantes que se añaden al producto principal con el fin de mejorar los resultados que el solo glifosato no obtendría (Witt, 1998; Ducar *et al.*, 2003). Los surfactantes son compuestos anfifílicos, es decir, que poseen un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico, por lo tanto, reduce la tensión superficial facilitando la adhesión del herbicida en la planta (Tu y Randall, 2003) y también modifican el proceso de osmosis de la membrana celular, transformando el mecanismo de transporte de membrana y vinculando al organismo naturalmente con el herbicida (Ramírez *et al.*, 2009).

El polioxi-etileno-amina es un surfactante derivado del sebo -tallowaminas- conocidas bajo el acrónimo POEA el cual es tensoactivo no iónico/catiónico derivado de grasas de origen animal, perteneciente a una clase más grande de

sustancias denominadas alquil-aminas-etoxiladas (ANEO), las cuales están conformadas por una molécula de amina, en contraposición al grupo alquilamina y dos cadenas de alcohol (Tush et al., 2013), caracterizado por un óxido la seboamina (Brausch, & Smith, 2007); variable en su cadena alquilo de 18 carbonos (14-18 C) y dos cadenas de etoxilos 14 (EO) (promedio de 15 C), (Lansurf TA15 de Lankem ®) POEA-TA15 presentación comercial y son prescritas para uso común con glifosato presentes en fórmulas de herbicidas de la marca Roundup® (Giesy et al., 2000).

Se estima que el POEA es más tóxico que el glifosato (Birch, 1977; Marc et al., 2002; Martínez y Brown, 1991) y también le proporciona mayor efectividad y propiedades tóxicas (Servizi, Gordon & Martens, 1987), asimismo el estudio de Nivia, (2000) indica que causa afecciones gastrointestinales, deterioro sistema nervioso central, genera destrucción de glóbulos rojos y ocasiona problemas respiratorios. De la misma manera, Tush et al., (2013) reporta altos niveles de letalidad en *Daphnia magna* (pulga de agua), *Lampsilis siliquoidea* (almeja), *Acartia tonsa* (copépodo), entre otras especies con dosis bajas de exposición a POEA.

La efectividad tóxica y modo de acción del surfactante POEA son minimizados considerablemente en condiciones sedimentarias, es decir, en presencia de aguas con mayor porcentaje de arcilla, carbono y masa microbiana y disminuye el riesgo de contaminación de las aguas y la intoxicación de sus individuos (Wang et al., 2005). Dicho proceso de adsorción del surfactante por partículas orgánicas sucede por la presencia de moléculas hidrofóbicas e hidrofílica (O'melia, 1989) que generan la unión del POEA a sólidos en suspensión (Rodriguez-Gil, 2016) por este motivo se considera utilizar carbonato de calcio (CaCO_3) en casos de campo, lo cual mitigaría los efectos de surfactante no iónico.

Para la presente investigación se escogió la cachama blanca *Piaractus brachypomus*, (Characidae) por ser una especie nativa de las cuencas del Orinoco y Amazonas, altamente contaminadas por fumigaciones directas e indirectas (Eslava-Mocha et al., 2007); se determinó CL_{50} , su interacción con el CaCO_3 , signos clínicos y lesiones.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioensayos del IALL, en la Estación Piscícola de la Universidad de los Llanos, vereda Barcelona, Villavicencio-Meta, Colombia con coordenadas 4°04'27.8"N 73°34'52.1"W.

Animales experimentales

Los individuos de estudio fueron juveniles de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* obtenidos de un mismo desove, clínicamente sanos con un peso corporal promedio de 5 g \pm 2,4 g.

Sustancias experimentales

Se utilizó POEA Polietoxi-etil-amina, compuesto de aminas de sebo etoxiladas polimerizadas, 100% de concentración (Lansurf TA15 de Lankem ®), indica que es liquido de color ámbar, presenta un pH 9 a 11 (1% acuoso), parcialmente soluble en agua y con densidad de 1,03g/cm³ [20°C (68°F)] y gravedad específica a 20°C de 1,03. Se empleó carbonato de calcio CaCO₃: grado analítico. Calcium carbonate ReagentPlus®; CAS Number: 471-34-1, Sigma-Aldrich, Alemania.

Diseño experimental

Se empleó un sistema semi-estático, en acuarios con aireación continua donde inicialmente se procedió a someter a un tratamiento con sal marina no yodada a una concentración de 0,5 g/L como medida profiláctica por tres días al momento de iniciar aclimatación. El periodo de aclimatación se hizo por 7 días, controlando los parámetros fisicoquímicos bajo unos intervalos de temperatura de 24 a 26 ° C; pH 7 \pm 0,5 y oxígeno disuelto 6,0 \pm 0,5 mg/L aproximadamente, además los animales fueron alimentados antes de comenzar los ensayos. Se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Concentración letal 50 (CL₅₀): El primer experimento corresponde a la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) a 96h de POEA, para lo cual se emplearon juveniles de cachama blanca (n=120), de un peso aproximado de 5,9 g, distribuidos en tanques de 50 L, correspondientes a 6 tratamientos, cada uno de 8 individuos. Se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento, descritos así: 1) **TT01**

Control (0 mg/L), 2) **TT02** POEA (0,2 mg/L), 3) **TT03** POEA (0.5 mg/L), 4) **TT04** POEA (1 mg/L), 5) **TT05** POEA (2 mg/L), 6) **TT06** POEA (4 mg/L). Estas concentraciones se han propuesto con base en lo hallado por Carvalho, (2013) quien efectuó dicho ensayo en *Prochilodus lineatus*; han sido tenidos en cuenta los hallazgos de (Giesy *et al.* (2000) en las cuales analizan concentraciones ambientales reales.

Determinación de la CL₅₀: El valor de CL₅₀ se calculó mediante un programa diseñado para calcular la dosis letal 50% de agentes tóxicos utilizando el método de Spearman-Kärber recomendado por la Organización Mundial de la Salud (Hamilton *et al.*, 1977). Para el empleo del programa, el operador suministró las dosis del agente toxico utilizado, el intervalo logarítmico entre las dosis, dosis que dan 0 y 100% de muerte, el número de animales utilizados en cada dosis letal 50% y el intervalo de confianza del 95% para la misma. El programa puede acondicionarse fácilmente para calculadoras programables (AU) (Carter, 1994).

Efectos del CaCO₃: En el segundo experimento fueron empleados juveniles de cachama blanca (n=56) de un peso aproximado 5 g distribuidos en acuarios de 50 L, correspondientes a 4 tratamientos, cada uno de 8 individuos. Realizamos 2 réplicas para cada uno de los tratamientos; los individuos estarán bajo una CL50 de POEA en un sistema semi-estático durante 96 horas, así: 1) **TT01** Control (0 mg/L), 2) **TT02** CaCO₃ (60 mg/L), 3) **TT03** POEA (2,1 mg/L), 4) **TT04** POEA (2,1 mg/L) + CaCO₃ (60 mg/L).

Para describir los signos clínicos y lesiones de los animales de los diferentes grupos experimentales se seguirán los lineamientos descritos por Yanong (2003) donde serán observados especialmente en relación con los aspectos: posición del animal en la columna de agua, eje de nado, patrón respiratorio, lesiones macroscópicas en la piel, aletas, órganos internos y lesiones microscopias en branquias, hígado, riñón y cerebro especialmente. Algunos animales que mueran durante el experimento, o algunos de los que sobrevivan a las 72 horas, fueron procesados para histopatología convencional, mediante fijación por medio de formalina bufferada 4%, se efectuará inclusión de tejidos en parafina y corte y coloración serán con hematoxilina eosina según el método estándar para

evaluación histopatológica (Luna, 1968); se procesaron para histopatología mínimo 3 animales por tratamiento.

Los parámetros de calidad del agua fueron medidos a diario y considerados dentro de los rangos normales para la especie (Sánchez-Bain *et al.*, 2004). y el valor de CL_{50} se determinó mediante el análisis de la mortalidad a las 96 horas por medio del programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0. Los datos se expresaron como media, desviación estándar, con un valor $p < 0.05$ considerado como significativo.

Parámetros de calidad de agua Los parámetros de calidad del agua fueron medidos diariamente y ajustados dentro de los rangos normales para la especie (Sánchez-Bain *et al.*, 2004).

Análisis estadístico El valor de CL_{50} se determinó mediante el análisis de la mortalidad a las 96 horas por medio del programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0. Los datos se expresaron como media, desviación estándar, con un valor $p < 0.05$ considerado como significativo.

RESULTADOS

Parámetros de calidad de agua Los parámetros de la calidad de agua se registraron a lo largo del experimento, en la tabla 2 se encuentra el promedio de la información registrada (Tabla 1).

Concentración letal 50 (CL_{50}) La toxicidad aguda a 96 horas en juveniles de cachama blanca en condiciones controladas mostró mortalidad solo en los tratamientos con 2 y 4 mg/L de POEA TA15. La mortalidad inicio a las 36 horas de exposición al tóxico en la concentración de 2 mg/L y a partir de la primera hora para la concentración de 4 mg/L.

Los valores más altos de mortalidad observada fueron hallados en las dos concentraciones más altas, en la concentración 2 mg/L se observaron a partir de las 36 horas los primeros descensos y en la concentración 4 mg/L a partir de la primera hora (Figura 1).

Signos clínicos Dentro de la identificación de los signos clínicos se halló que los animales expuestos a 1 mg/L de POEA no evidenciaron cambios en el patrón de nado hasta las 48 horas, posterior a las cuales se evidenciaron pérdida de comportamiento grupal y angustia respiratoria. En el grupo expuesto a 2 mg/L se identificó letargo y pérdida del comportamiento grupal a las 5 horas, lo cual difiere de lo hallado en el grupo de 4 mg/L de POEA en el cual el letargo fue evidente a los 10 minutos y el comportamiento grupal después de una hora. Finalmente, en las concentraciones de 2 y 4 mg/L fue evidente el nado errático, pérdida del eje y prolapso del labio inferior, los peces a una hora de exposición ascendían su posición con respecto a la columna de agua hasta perecer.

Hallazgos de necropsia En el tratamiento control no se halló ninguna anomalía evidente, a concentraciones de 0,2mg/L se observó un leve cambio en la coloración, puesto que se tornó más oscura, congestión de branquias, aletas y piel. A concentraciones de 0,5 y 1 mg/L reflejan erosiones leves de aletas y piel, moderada congestión, hemorragias en boca, leve aumento de líquido abdominal y erosiones en pedúnculo caudal.

A concentración de 2 y 4 mg/L de POEA TA15 fueron halladas erosiones en las aletas caudal, dorsal, pectoral y adiposa, cambios de coloración en la piel observándose los animales, hemorragias y erosiones en arcos branquiales, áreas de isquemia; a 2 mg/L se localizó áreas de congestión en la cavidad oral, erosiones pedunculares y aumento leve de líquido en cavidad abdominal, congestión y coloración moteada en riñón posterior, hemorragias en meninges además erosiones en pedúnculo caudal y a 4 mg/L hemorragias petequiales, congestión y hemorragia severa en cavidad oral a nivel de techo y base, hemorragia en arcos branquiales, aumento del líquido de la cavidad celómica, hemorragias severas en meninges y erosiones en pedúnculo caudal.

Hallazgos de histopatología

Piel: En el tratamiento control no se evidenciaron alteraciones de ningún tipo, por el contrario, la morfología se observó normal a nivel microscópico (Figura 2). A

concentraciones de 0,2 mg/L se presentaron erosiones muy leves, a 0,5 mg/L leves erosiones de la epidermis, a 1 mg/L leve hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis. A 2 mg/L también se evidenció, pero en forma moderada, hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis y moderadas erosiones en epidermis. A 4 mg/L se hallaron erosiones moderadas en epidermis, úlceras, hemorragias e hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis (Figura 3).

Branquias: En el tratamiento control no se evidenciaron alteraciones branquiales significativas únicamente un leve desprendimiento epitelial, en términos generales mostraron sus estructuras en buen estado (Figura 4). Los peces expuestos a concentraciones de 0,2 mg/L presentaron una leve hipertrofia del epitelio interlamelar, a 0,5 mg/L se evidencia un leve edema intercelular y leve ruptura de células pilar, a 1 mg/L se presentó leve ruptura de la célula pilar y de forma moderada aneurisma lamelar y congestión de los filamentos, a 2 mg/L fue evidente de forma leve una fusión lamelar total, depósitos intracelulares, atrofia lamelar y atrofia del filamento, de forma moderada edema intercelular, fusión parcial lamelar, ruptura de pilar, desprendimiento epitelial, pleomorfismo nuclear, necrosis, hipertrofia del epitelio interlamelar, hipersecreción epitelial e hiperplasia epitelial arco, hiperplasia de células de moco, presencia de centros melanomacrófagos CMM e infiltración de leucocitos, de forma severa congestión de filamentos e hiperplasia interlamelar, a 4 mg/L se encontró se forma moderada dilatación del ápex lamelar, dilatación de la base lamelar, edema intercelular, pleomorfismo nuclear, cambio de la curvatura lamelar, hiperplasia interlamelar e hipersecreción epitelial, de forma severa aneurisma lamelar, congestión del filamento, hemorragias, fusión lamelar, depósitos intracelulares, ruptura de célula pilar, desprendimiento epitelial, atrofia lamelar, atrofia del filamento, necrosis, hipertrofia del epitelio interlamelar, hiperplasia epitelial del arco, hiperplasia de células de moco, respuesta inflamatoria e infiltración de leucocitos (Figura 5).

Hígado: En el tratamiento control no se hallaron lesiones significativas (Figura 6), a concentraciones 0,2 y 0,5 mg/L leves cambios degenerativos y picnosis nuclear, a 1 mg/L leve necrosis multifocal de hepatocitos y de moderados cambios

degenerativos, a 2 mg/L leve picnosis nuclear y de manera moderados cambios degenerativos (infiltración grasa) y alteraciones vasculares hemorrágicas, y a 4 mg/L de forma moderada necrosis multifocal de hepatocitos y severos cambios degenerativos (infiltración grasa) (Figura 7).

Telencéfalo: En el tratamiento control no se hallaron anormalidades (Figura 8), a concentraciones de 0,2 mg/L evidenció una leve infiltración CGE-Te y gliosis/satelitosis-Te, a 0,5 mg/L se manifestó una leve infiltración CGE-Te, a 1 mg/L se observó leve hemorragia de las meninges, necrosis/apoptosis de neuronas, moderada gliosis/ satelitosis-Te, a 2 mg/L se evidenció leve necrosis/apoptosis de neuronas, moderada gliosis/ satelitosis-Te y severa infiltración CGE-Te, a 4 mg/L fue evidente moderadas hemorragias de las meninges, severa infiltración CGE-Te, gliosis/ satelitosis-Te y necrosis/apoptosis de neuronas (Figura 9).

Diencéfalo: En el tratamiento control y a concentraciones de 0,2 mg/L no se encontraron daños significativos (Figura 10), a 0,5 mg/L se evidencio leve satelitosis, espongiosis /dilatación de espacios perivasculares, edemas al rededor del neurópilo, necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum, a 1 mg/L se halló leve necrosis en general y de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum, a 2 mg/L se manifestó moderada espongiosis /dilatación de espacios perivasculares y necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum y a 4 mg/L se encontró moderada satelitosis, severa espongiosis /dilatación de espacios perivasculares, edemas al rededor del neuropilo y necrosis de cuerpos coroideos /Sacum vasculosum (Figura 11).

Riñón Craneal: : En el tratamiento control, concentraciones de 0,2 y 0,5 m/L no se hallaron lesiones significativas (Figura12), a 1 mg/L se halló una leve hiperplasia del tejido glandular interrenal, y alteraciones vasculares /trombosis, a 2 mg/L se encontró leves alteraciones vasculares /trombosis, moderada hiperplasia del tejido glandular interrenal y necrosis glandular Interrenales (Figura 13), a 4 mg/L fue evidente una leve necrosis glandular interrenal, moderada hiperplasia del tejido glandular interrenal y alteraciones vasculares /trombosis.

Riñón posterior: En el tratamiento control no se presentaron alteraciones significativas (Figura 14), a concentraciones de 0,2 y 0,5 mg/L se evidenció una leve degeneración tubular y aumento de los CMM en parénquima (Figura 15), a 1 mg/L fue evidente el moderado aumento de CMM en parénquima y moderada degeneración tubular; a 2 mg/L presento leve inflamación intersticial, glomerulitis y degeneración glomerular, moderada degeneración y necrosis tubular, a 4 mg/L revela moderada degeneración glomerular e inflamación intersticial, evidenció lesiones severas como degeneración tubular, necrosis tubular, glomerulitis y aumento de CMM en parénquima.

Efectos del CaCO_3 : La toxicidad aguda de la exposición a POEA TA15 junto con el carbonato de calcio fue evaluada en condiciones controladas donde se observó que no hubo mortalidad de los peces en las concentraciones TTO1 (0 mg/L) y TTO 2 (CaCO_3 60 mg/L). No obstante, el TTO 3 el cual contenía POEA en un valor de CL50 mostró una mortalidad del 50% (7/14) a las 38 horas de realizada la exposición y en el TTO 4 (CaCO_3 60 mg/L + POEA 2,1 mg/L) 9 individuos murieron en un transcurso de 20 horas de comenzado el ensayo.

Signos clínicos En la identificación de los signos clínicos se halló que en los tratamientos control y 2 no se manifestaron signos relevantes, a partir del TTO3 (POEA 2,1mg/L) se presentó letargo a partir de las primeras 4 horas después de la exposición, pérdida de comportamiento gregario del cardumen y cambio del patrón de nado después de 8 horas, aumento de la frecuencia opercular y prolapso del labio inferior después de 10 horas, pérdida del eje de nado después de 11 horas y ascenso de los individuos en la columna de agua a partir de las 11 horas. Por otro lado, en cambio en el TTO4 (CaCO_3 60mg/L + POEA 2,1 mg/L) se presentó letargo a partir de las primeras 6 horas de iniciado el experimento, pérdida de la formación en cardumen después de 7 horas, cambio del patrón de nado y ascenso de la mitad de los individuos en la posición de la columna de agua a las 9 horas, pérdida del eje de nado, nado errático y prolapso del labio inferior a las 11 horas y por último presentó angustia respiratoria después de 12 horas de exposición.

Hallazgos de necropsia En los primeros tratamientos control y 2 no aparecieron anormalidades evidentes, En el tratamiento 3 se evidenció hemorragia en la piel, erosiones en aletas, cambio de coloración en branquias, congestión y hemorragia, congestión leve en boca, congestión en la meninges y leve aumento en liquido abdominal. Por otro lado, en el tratamiento 4 se evidenciaron leves erosiones en aletas, leve congestión en piel y las branquias presentaron coloración homogénea

DISCUSIÓN

El valor de la CL50 de POEA hallado en el primer experimento (2,08 mg/L) fue similar a reportado por Folmar et al. (1979) quienes trabajaron con Trucha arcoíris *Salmo gairdneri* (*Oncorhynchus mykiss*) (2 mg/L) e inferior al hallado por Brausch y Smith (2007) con Salmón rojo *Oncorhynchus nerka* (2,6 mg/L). Así mismo se relacionó esta información con la CL50 de diferentes surfactantes, trabajos como los de Buhl & Hamilton, (2000) que expusieron juveniles de trucha arcoiris a Alquilbenceno sulfonado lineal (LAS) con longitud promedio de la cadena alquil C11, 4 obteniendo como resultado CL50 (5 mg/L), también trabajó con Dodecil sulfato sódico (SDS) obteniendo una CL50 de (24,9 mg/L) lo cual está muy por encima del resultado del presente trabajo. Además, Krogh et al., (2003) determinaron el valor de CL50 de alcoholes etoxilados en salmón *Salmon salar* L. de 1,5 mg/L y de alquil-aminas etoxiladas obteniendo una CL50 de 0,09-0,78 mg/L, los cuales están por debajo de lo hallado en el presente estudio. Al confrontar esta información examinamos que los compuestos aniónicos LAS y SDS presentaron CL50 altas por el contrario los compuestos no iónicos revelaron CL50 bajas, esto implica que los últimos son más tóxicos.

Los juveniles de cachama blanca expuestos a concentraciones de 1, 2 y 4 mg/L de POEA TA15 evidenciaron signos de intoxicación, tales como lesiones erosivas en piel y aletas los cuales fueron más severos en las concentraciones más altas. Los cambios en el comportamiento como letargo, pérdida de comportamiento gregario de cardumen y angustia respiratoria, aunque bajo las dos últimas concentraciones (2 y 4 mg/L) además de manifestar la sintomatología ya descrita, también se presentó la pérdida del eje de nado, el nado errático, el prolapso del labio inferior y

finalmente el cambio de posición hacia la parte superior de la columna de agua. Dichos cambios comportamentales son descritos en trabajos de Lewis, (1991) con pececillo cabezón *Pimephales promelas*, también estos signos también se han descrito en trabajos como el de Navarro, y Martinez, (2014) con bocachico *Prochilodus lineatus*. Descripciones similares se hallaron en otros estudios de toxicidad como en hidrocarburos clorados Omitoyin et al. (2006) con *Clarias gariepinus*, ensayos con Roundup® en *Piaractus brachypomus* por Ramírez et al. (2004) y mezcla de herbicidas Roundup® y Cosmoflux® 411F por Ramírez et al. (2009). Este tipo de alteraciones del comportamiento se pueden deber a daños en el sistema nervioso central (Nivia, 2000; Peña y Carter, 2001).

Se hallaron lesiones importantes en piel y aletas en los grupos expuestos a 2 y 4mg/L de POEA TA15, (Figura 4) sugieren que el compuesto puede ser corrosivo para los peces como ha sido propuesto por Abel & Skidmore, (1975). Los hallazgos histopatológicos branquiales, renales, hepáticos y cerebrales son similares a los descritos por Ramírez-Duarte et al., (2006) y Rondón-Barragán et al. (2007).

En cuanto a las alteraciones histopatológicas en la piel se evidenció que a concentraciones de 2 mg/L y 4 mg/L aparece moderada hiperplasia/hipertrofia de células epiteliales de alarma de la epidermis y erosiones en epidermis, puesto que los surfactantes tienen la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana celular, alterando el componente lipídico de células de alarma, epiteliales y de moco (Abel & Skidmore, 1975; Bols et al., 2001 y Rondón-Barragán et al., 2007). De la misma manera en individuos expuestos a 4mg/L aparecieron úlceras y hemorragias que fueron generadas por que paulatinamente las células pilar se hallaron laxas y generaron apoptosis como es descrito por Rondón-Barragán et al., (2007).

En branquias se halló hiperplasia del epitelio interlamelar y del arco branquial, atrofia lamelar, del mismo modo fusión lamelar; esta clase de lesiones afirman el tipo de respuestas comunes ante el daño branquial Noga (2000); casualmente el

epitelio puede llegar a un desprendimiento y la estructura lamelar perder su conformación y anonadamiento. De la misma manera esta clase de exposición a tóxicos puede ocasionar una pronta destrucción lamelar en un corto lapso de tiempo (Heath, 1995).

También reveló hiperplasia de las células de moco las cuales aparecen como forma de estrategia para evitar expansión para evitar mayor distribución del agente tóxico, además es como un mecanismo compensatorio a la probable alteración de electrolitos (Lin y Randall 1995). La fusión lamelar, desprendimiento epitelial y edema intercelular son lesiones que están directamente relacionadas con el hecho de ser una respuesta de adaptación que protege la homeostasis electrolítica. (Mallatt, 1985). Las hemorragias y aneurismas observadas en los peces expuestos a POEA probablemente están asociados a la capacidad irritante que tiene este surfactante (Roberts y Rodger, 2001); Además, la exposición causó hiperplasia epitelial branquial y generó necrosis lo que redujo la permeabilidad del oxígeno, provocando un deterioro de la función respiratoria y la pérdida sus funciones en consecuencia produciendo hipoxia (Peña y Carter, 2001; Messaad y Al Zailaie, 2017). Lesiones similares han sido descritas ante el uso de organofosforados en pez cachorro árabe *Aphanius dispar* por Ba-Omar y Al-Jardani, (2011).

Se presentaron alteraciones en el hígado en animales expuestos a POEA e incluyeron cambios degenerativos de moderados a severos en la concentración más alta. También se halló necrosis multifocal de hepatocitos las cuales se asemejan a las alteraciones en hepatocitos descritas por Szarek et al., (2000), quienes trabajaron con Roundup® en carpa *Cyprinus carpio*. Así mismo se presentó en el tratamiento 5 leve picnosis nuclear, probablemente una muerte celular por apoptosis (Rojas, et al., 2013).

En cuanto al telencéfalo se presentó en el tratamiento 5 leve necrosis/apoptosis de neuronas, moderada gliosis/satelitosis-Te y severa infiltración CGE-Te similares a las descritas por Rondón-Barragán et al., (2007) cuyo trabajo fue en individuos de la misma especie, pero utilizando el surfactante Cosmoflux 411f. En el tratamiento

6 se hallaron estas mismas lesiones, pero de mayor severidad acompañadas de hemorragias moderadas en las meninges, similares a lo evidenciado por Rondón-Barragán et al. (2007) También se presentó necrosis/apoptosis de neuronas lo cual ha sido reportado en otros estudios (Ramírez-Duarte et al., 2008). Además, fue evidente infiltración de lesiones por células granulares eosinofílicas CGE en los tratamientos de mayor concentración con alteraciones severas en el sistema de líquido cefalorraquídeo (figura 8), y en el diencéfalo se reporta espongiosis, edemas alrededor del neuropilo, se hallaron zonas de muerte neuronal y necrosis en cuerpos coroideos// Sacum vasculosum (figura 9). Los daños reportados generan como resultado una posible alteración y cambios en el comportamiento grupal como los manifestos en el cuadro de signos clínicos (tabla 6) similar a lo reportado por Rondón-Barragán et al. (2007). Es muy importante considerar que es la primera vez que se realiza una descripción de estas lesiones en el sistema nervioso central provocadas por la exposición de POEA en peces, sin embargo, ya existen reportes de lesiones con Roundup® (Ramírez et al., 2004; Ramírez-Duarte et al., 2006; Ramírez et al., 2008); Cosmoflux® 411f (Ramírez et al., 2009; Rondón-Barragán et al., 2007).

En el riñón se observó glomerulitis, degeneración tubular, necrosis, aumento de CMM en parénquima similares a los reportes hechos por Ramírez et al., (2009). En el segundo ensayo donde se evaluó la interacción del POEA a concentración de CL50 y se hallaron porcentajes de mortalidad de 0% en el tratamiento control (0 mg/L) y 2 (CaCO₃ 60 mg/L), 50% de mortalidad en el tratamiento 3 POEA (2,1 mg/L) en 38 horas de exposición, corroborando de esta manera lo encontrado en el primer ensayo (figura 2) y 64,2% de mortalidad en el tratamiento 4 (CaCO₃ 60 mg/L + POEA 2,1 mg/L) a las 24 horas de empezada la exposición (Tabla7); se evidenció que el POEA no presento afinidad por los sedimentos (CaCO₃) como se esperaba; Rodríguez-Gil et al., (2016), Wang et al. (2005) sugieren que organismos asociados a medios acuáticos de sistemas lenticos con presencia de sedimentos tienen menores probabilidades de verse afectados al POEA. Por el contrario, el POEA aumentó la toxicidad, esta condición corresponde al cambio de

este surfactante de ser un compuesto catiónico a pH neutro y ácido, al volverse no iónico en pH alcalino (Tsui & Chu, 2003).

Con respecto a los signos clínicos en el tratamiento 3 aparecieron a partir de las 4 horas de comenzado el mismo, así mismo en el tratamiento 4 aparecieron a partir de las 6 horas de iniciado, los primeros descensos en el tratamiento 3 ocurrieron a las 11 horas desde la exposición y la mitad de los individuos perecieron a las 38 horas, de la misma manera en el tratamiento 4 los primeros descensos se obtuvieron a las 8 horas de iniciada la exposición y a las 9 horas la mitad de los individuos perecieron.

El surfactante No Iónico POEA-TA15 es un compuesto altamente tóxico para la cachama blanca, produce mortalidad y lesiones severas en piel, aletas, branquias, hígado, telencéfalo, riñón, entre otros órganos. Este tipo de surfactante no ionizado hace parte de formulaciones comerciales de herbicidas a base de glifosato usadas en Colombia. Así mismo, se observó que la interacción entre el POEA y CaCO_3 a dosis de 60 mg/L no es favorable para evitar signos y las lesiones asociadas al surfactante.

En 2016 la Comisión Europea recomendó prohibir el uso de mezclas con POEA, según reglamento de ejecución de la comisión europea (UE) 2016/1313, recomendando retirar del uso productos fitosanitarios a base de glifosato que contengan el coformulante tallowamina polietoxilada (n.o CAS 61791-26-2), dicho reglamento fue modificado por los estudios de toxicología vinculados con el POEA ejecutados por la Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), [Eur-lex.europa.eu](http://eur-lex.europa.eu) (2016). Por estas razones, en nuestro medio se sugiere el uso responsable de esta clase de sustancias en entornos acuáticos o próximos a ellos y la trascendencia de instaurar y mejorar normativas sobre el empleo de sustancias asociadas al glifosato y demás químicos vinculados al agro.

CONCLUSIONES

- La CL50 a 96 horas del POEA TA15 en juveniles de cachama blanca *Piaractus brachipomus* fue de 2,08 mg/L, con un intervalo de confianza del 95% (1,799-2,405).
- Los individuos expuestos a POEA (TA-15) mostraron signos de letargo, desagrupamiento, angustia respiratoria, cambios en el patrón y eje de nado, prolapso del labio inferior y elevación con respecto a la columna de agua, reflejando señales de intoxicación desde concentraciones de POEA de 1 mg/L.
- Los individuos expuestos al POEA TA15 revelaron lesiones a nivel macroscópico principalmente cambios de coloración en la piel, erosiones en piel y aletas, hemorragia en boca y arcos branquiales, hemorragias petequiales en piel, aumento del líquido de la cavidad celómica y hemorragias severas en meninges.
- Se presentaron lesiones severas en piel, branquias, hígado, telencéfalo, diencéfalo y riñón en las concentraciones de 2 mg/L y 4 mg/L de POEA-TA15 siendo, por tanto, un compuesto que por sí solo es más irritante que las mezclas comerciales como el Roundup en cachama blanca.
- La interacción entre el POEA-TA15 y CaCO_3 no es favorable para evitar la mortalidad y lesiones en peces.
- Dado que esta clase de sustancias no son controladas por la legislación Colombiana y al encontrar una CL50 tan baja, considerando los efectos altamente tóxicos del POEA para cachama blanca, así como las acciones tomadas por la Unión Europea en 2016, es importante que las autoridades y organismos de control ambiental colombianos aborden la revisión de las licencias de las mezclas comerciales disponibles ante las expectativas de un mayor uso de herbicidas frente al desarrollo agrícola actual de los Llanos.

Referencias

Abel P. D. (1975). Skidmore JF. Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. *Wat Res*; 9:759-765.

Álvarez, M., Gimenez, I. T., Saitua, H., Enriz, R. D., & Giannini, F. A. (2012). Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta toxicológica argentina*, 20(1), 5-13

Arcos, A. B., & Figueroa, M. A. I. (2007). Toxicidad del glifosato en peces como indicadores biológicos, y análisis de sus efectos sobre el ambiente y la salud humana. *Sección artículos originales*, 16.

Ardila, G. A. (2009). Efectos del glifosato sobre la ganancia de peso y el crecimiento en alevinos de Yamú, *Brycon Amazonicus*.

Argüello-Rangel, J., Triana-García, P. A., & Eslava-Mocha, P. R. (2015). Células Granulares Eosinofílicas/Células Mast (CGE/MC) y su relación con los efectos de herbicidas: Caso del Glifosato y surfactantes acompañantes en peces. *Orinoquia*, 19(1), 59-76.

Arias, J. (1988). Apuntes sobre el cultivo de la cachama en el Meta. *Agrometa*, 20, 9-10.

Ba-Omar, T. A., Al-Jardani, S., & Victor, R. (2011). Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*, 43(1), 29-38.

Baptiste, G. (2006). Utilizar. In H. Correa, S. L. Ruiz, & L. M. Arevalo (Eds.), *Plan de Acción en Biodiversidad de la Cuenca del Orinoco, Colombia 2005e2015* (pp. 330). Bogotá: Instituto de Investigaciones en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Benachour, N., & Seralini, G. E. (2008). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical research in toxicology*, 22(1), 97-105.

Birch, M. D. (1977). Toxicity Studies on POEA. Unpublished report, Younger Laboratories, Inc., St. Louis, MO

Bols N. C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* ; 25: 853-873.

Brausch, J. M., & Smith, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp,

Thamnocephalus platyurus. Archives of environmental contamination and toxicology, 52(2), 217-221.

Buhl, K., Hamilton, S. (2000). Acute toxicity to fire-control chemicals, nitrogenous chemicals, and surfactants to rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society. 129: 408-418. 14. BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., MEIER, W. 2000. Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. Environ. Safety. 46:34-40.

Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., ... & Cuevas, A. G. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. Science of the Total Environment, 429, 2-35.

Carter, A. (1994). Using the Spearman–Karber method to estimate the ED50. In SAS Conference Proceedings, Dallas-USA (pp. 1120-1225).

Carvalho, C. D. (2013). Efeitos do surfactante de polioxietileno amina (POEA) em parâmetros genéticos, bioquímica e fisiológica do teleósteos *Prochilodus lineatus*. - Londres, 81f.: I

Diamond G y Durkin, P. (1997). Effects of surfactants on the toxicity of glyphosate, with specific reference to rodeo. Prepared under USMA FS Contract No. 53-3187-5-12. Final Report. February 6, 1997.

Díaz, F., y López, R. (1993). El cultivo de la cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomum*). Fundamentos de Acuicultura Continental. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá, Colombia. p, 207-219.

Ducar, J., Tredaway., Macdonald, G. (2003). Adjuvants. Series of Agronomy Department, University of Florida. Abril, 5 p

El país. (11 enero 2017) Colombia inició fumigación manual con glifosato contra cultivos de coca. Recuperado de: <http://www.elpais.com.co/colombia/inicio-fumigacion-manual-con-glifosato-contra-cultivos-de-coca.html>

Eslava-Mocha, P. R., Ramírez-Duarte, W. F., & Rondón-Barragán, I. S. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Universidad de los Llanos. Colombia.

Eur-lex.europa.eu. (2016). EUR-Lex - 32016R1141 - EN - EUR-Lex. [online]
Available at:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32016R1141>
[Accessed 17 May. 2018].

Fernícola, N. A. (1985). Toxicología de los insecticidas organoclorados. Bol. Of. San
Panam. 98(1): 10 – 18.

Folmar, L. C., Sanders, H. O. & Julin, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide
glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates.
Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 8, 269-278.

Foy, C. L., & Pritchard, D. W. (1996). Pesticide formulation and adjuvant
technology. CRC press.

Gamboa Gutiérrez. (1998- 2002). “Ni una sola mata de coca”: Las políticas de
erradicación de cultivos ilícitos en Colombia. Facultad de ciencias Humanas.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Giesy, J. P., Dobson, S. Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment
for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167, 35-120.

Granda, M. N. M., & Aguirre, M. B. (2016). La cachama blanca (*Piaractus
brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. Revista
Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20(1), 79-86.

González-Torralva, F., Pérez-López, M., & De Prado, R. (2013). Resistencia A
Glifosato: Aspectos Biológicos Y Agronómicos. Viabilidad Del Glifosato En
Sistemas Productivos Sustentables.

Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-
Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.
Environmental Science & Technology, 11(7), 714-719.

Harte J., Holdren C., Schneider R., Shirley C. (1991). Guía de las sustancias
contaminantes. En: El libro de los tóxicos de la A a la Z. Ed. Grijalbo, Argentina,
642 pp.

Heath A. (1995). Water pollution and fi sh physiology. 2nd edition. CRC Press,
Boca Raton.

Henao Muñoz, L. M. (2014). Toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada del Glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-flux® 411F en renacuajos de anuros colombianos.

Henao Muñoz, L. M., Triana Velásquez, T. M., & Bernal Bautista, M. H. (2015). Toxicity Assesment of Two Agrochemicals, Roundup® Active and Cosmo-Flux® 411F, to Colombian Anuran Tadpoles. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 153-161.

Hernández A. (1994). Estado actual del cultivo de Colossoma y Piaractus en Brasil, Colombia, Panamá, Perú y Venezuela. Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura y V Seminario Nacional de Acuicultura, Acuicultura y Desarrollo Sostenible. Santafé de Bogotá, p. 9–23.

Howe C. M., Berrill M., Pauli D.B., Helbing C.C., Werr K., Veldhoen N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem* 23:1928–1938.

IARC, (2015). International Agency for Research on Cancer Volume 112: Some organophosphate insecticides and herbocides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon ang glyphosate. IARC Working Group. Lyon;3-10 March 201. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum.

Justicia, (5 mayo 2016). Reanudar uso de glifosato es una contradicción del Gobierno:Ordoñez. El Tiempo.
<http://www.eltiempo.com/politica/justicia/procurador-dice-que-reanudar-uso-del-glifosato-es-una-contradiccion-del-gobierno/16582933>

Krogh. K., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B. & Vejrup, K. (2003). Environmental properties and effects of nonionicsurfactant adjuvants in pesticides: a review.Chemosphere. 50: 871-901.

Lankem.eu. (2018). [online] Available at: <http://www.lankem.eu/assets/lansurf-ta15-tds-en.pdf> [Accessed 5 Mayo 2018].

Lewis M. A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Res*; 25: 101-113.

Lin H. y Randall D. (1995). Proton pumps in fish gills, p.229-255. In: Hoar W.S., Randall D.J. & Farrell A.P. (Ed.), *Fish Physiology: cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. Academic Press, New York. 388p.

Luna, L.G. (1968). Manual histologic staining methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. Mc Graw, Nueva York. 258 p.

Maldonado-Campo, J. A., Bogotá-Gregory, J. D., & Usma, J. S. (2009). Peces. In M. H. Romero, J. A. Maldonado-Campo, J. D. Bogotá-Gregory, J. S. Usma, A. M. Umaña-Villaveces, J. I. Murillo, S. Restrepo-Calle, M. Álvarez, M. T. Palacios-

Lozano, M. S. Valbuena, S. L. Mejía, J. Aldana-Domínguez, & E. Payán (Eds.), Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2007e2008: piedemonte orinoquense, sabanas y bosques asociados al norte del río Guaviare (pp.151). Bogotá D.C., Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Mallatt J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. Can J Fish Aquat Sci; 42: 630-648.

Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G. & Belle R. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. Chemical Research in Toxicology, 15: 326–331

Martínez T.T. & Brown K. (1991). Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. Proceedings of the Western Pharmacology Society, 34: 43–46

Messaad, I. A., & Al Zailaie, K. A. (2017). Evaluation of Glyphosate Toxicity on Arabian killifish, *Aphanius dispar* Collected from Southwestern Saudi Arabia.

Mottier, A., Pini, J., & Costil, K. (2014). Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The Journal of toxicological sciences, 39(2), 211-215.

Navarro, O. J., Velasco Santamaría, Y. M., & Cruz Casallas, P. E. (2004). Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 17(4).

Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (1997). Conventional agricultural development models and the persistence of the pesticide treadmill in Latin America. The International Journal of Sustainable Development & World Ecology, 4(2), 93-111.

Nivia, E. (2000). Impacto de la Fumigaciones en Zonas de cultivos Ilícitos; En: Castañeda, D.; M. Castro; A. Medina y M. E. Bernal. Cultivos Ilícitos en Colombia.

Memorias del Foro realizado el 17 y 18 de agosto de 200, Universidad de los Andes. Ediciones Uniandes. Bogotá. pp. 133-141.

Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J., & Blust, R. (2011). Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PLoS One*, 6(11), e24139.

Noga J. (2000). *Fish disease. Diagnosis and treatment*. USA: Iowa State University Press. 497 p.

O'melia, C. R. (1989). Particle—particle interactions in aquatic systems. *Colloids and surfaces*, 39(1), 255-271.

Omitoyin, B. O. (2006). Haematological changes in the blood of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juveniles fed poultry litter. *Livestock research for rural development*, 18(11), 200.

OMS (Organización Mundial de la Salud), 1994. *El glifosato: criterios de salud ambiental* 159. Ginebra.

Onil, S. (2001). Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Organización Panamericana de Salud. Instituto Nacional de salud pública de Quebec.

Ostera, J. M., Malanga, G., & Puntarulo, S. (2016). Actualización sobre aspectos oxidativos del efecto del glifosato en sistemas biológicos/ An update on the effects of glyphosate on the oxidative state in biological systems. *biotecnica*, 18(2), 3-10.

Peña, C., & Carter, D. (2001). *Toxicología Ambiental, Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*, The University of Arizona.

Ramírez-Duarte, W. F., Rondón-Barragán, I. S., Vidal, H. H., & Eslava-Mocha, P. R. (2004). Toxicidad del Roundup® en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), concentración letal 50, observaciones clínicas y lesiones asociadas. In *Memorias del II Congreso Colombiano de Acuicultura, X Jornada de Acuicultura IALL: Retos frente a la globalización de mercados* (pp. 27-29).

Ramírez-Duarte, W. F., Rondón-Barragán, I. S., & Eslava-Mocha, P. R. (2005) *Surfactantes asociados a herbicidas: Efectos sobre organismos acuáticos*. 9(2)

Ramírez-Duarte, W. F. (2006). Evaluación anatomopatológica de los efectos tóxicos agudos del Roundup® en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). [Trabajo de grado] Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias y recursos naturales; 2006. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta, Colombia.

Ramírez-Duarte W.F., Rondon-Barragan I.S., Eslava-Mocha P.R. (2008). Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq Vet Bras.*;28(11):547-554

Ramírez, D., Rondón, B., Vidal, B., & Eslava, M. (2009). Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411f. *Revista MVZ Córdoba*, 14(1), 1563-1575.

Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75

Rankine, B. B. (2015). Examination of the Environmental Fate and Effects of POEA in Shallow Freshwater Ecosystems (Doctoral dissertation, The University of Manitoba).

Relyea R.A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15:1118–1124.

Roberts R.J. & Rodger H.D. (2001). The pathophysiology and systematic pathology of teleost, 55-132. In: Roberts R.J. (Ed.), *Fish Pathology*. 3rd ed. W.B. Saunders, London.

Rodriguez-Gil, J. L., Lissemore, L., Solomon, K., & Hanson, M. (2016). Dissipation of a commercial mixture of polyoxyethylene amine surfactants in aquatic outdoor microcosms: Effect of water depth and sediment organic carbon. *Science of the Total Environment*, 550, 449-458.

Rojas, L. M., Mata, C., Oliveros, A., & Salazar-Lugo, R. (2013). Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas. *Revista de Biología Tropical*, 61(2).

Romero-Ruiz, M. H., Flantua, S. G. A., Tansey, K., & Berrio, J. C. (2012). Landscape transformations in savannas of northern South America: Land

use/cover changes since 1987 in the Llanos Orientales of Colombia. *Applied Geography*, 32(2), 766-776.

Rondón-Barragán, I. S., Ramírez-Duarte, W. F., & Eslava-Mocha, P. R. (2007). Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(4).

Ross, A. R., & Liao, X. (2015). A novel method for the rapid determination of polyethoxylated tallow amine surfactants in water and sediment using large volume injection with high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 889, 147-155.

Ruiz-Toledo, J., & Sánchez-Guillén, D. (2014). Efecto de la concentración de glifosato presente en cuerpos de agua cercanos a campos de soya transgénica sobre la abeja *Apis mellifera* y la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula*. *Acta zoológica mexicana*, 30(2), 408-413.

Salazar-López, N. J., & Madrid, M. L. A. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Biotecnia*, 13(2), 23-28.

Salazar N. y Aldana M. (2011). Glyphosate herbicide: uses, toxicity and regulation. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Mexico. 31: 117–165.

Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G., & Ronco, A. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. CIID, Ottawa, ON, CA.

Serrano, S. H. (2016). Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2016. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Bogotá DC, Boletín Técnico No. 00.02. 97. 13

Servizi, J. A., Gordon, R. W., & Martens, D. W. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 39(1), 15-22.

Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, E. J. P., & Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 43-125). Springer New York.

Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., & Banaszkiewicz, T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine environmental research*, 50(1-5), 263-266.

Tsui, M. T., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197.

Tu, M., y Randall, J. (2003). Chapter 8—Adjuvants. *Weed Control Methods Handbook*, The Nature Conservancy.

Tush, D., Loftin, K. A., & Meyer, M. T. (2013). Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1319, 80-87.

Varona, M., Henao, G. L., Díaz, S., Lancheros, A., Murcia, Á., Rodríguez, N., & Álvarez, V. H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*, 29(3).

Vera, M. S. (2011). Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Wang, N., Besser, J. M., Buckler, D. R., Honegger, J. L., Ingersoll, C. G., Johnson, B. T., ... & McKee, M. J. (2005). Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59(4), 545-551.

Wehtje, G. and R.H. Walker, 1997. Interaction of glyphosate and 2,4-D for the control of selected morninglory (*Ipomoea* spp.) species. *Weed Technology* 11: 152-156.

Williams, G.M., Kroes, R., Munco, C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans. *Regul. Toxicology. Pharm.* 31, 17-65.

Witt, J. (1998). Agricultural Sprayadjuvants Extension Chemist and Toxicologist Oregon State University. 5123 Comstock Hall Cornell University Ithaca, New York. Last Modified: 05/08/1998 © 2002 Cornell University- on-line

Yanong R. (2003). Necropsy Techniques for fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. 13(2): 89-105.

Tablas y figuras

Tabla 1. Parámetros de calidad de agua en fase experimental.

| Parámetros | Temperatura (°C) | pH | Oxígeno disuelto (ppm) |
|----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| Día 1 \bar{X} | 26,2 | 7,6 | 7,2 |
| Día 2 \bar{X} | 26,9 | 7,3 | 7,15 |
| Día 3 \bar{X} | 26 | 6,6 | 7 |
| $\bar{X} \pm \sigma$ | 26,03 \pm 0,1527 | 7,16 \pm 0,5131 | 7,11 \pm 0,010 |

Tabla 2. Mortalidad de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachipomus* en 6 concentraciones de POEA durante 96 horas

| Tiempo (h) | CL ₅₀ POEA TA15 (mg/L) | | | | | |
|------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | TTO1 (0) | TTO 2 (0,2) | TTO 3 (0,5) | TTO 4 (1) | TTO 5 (2) | TTO 6 (4) |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 24 |
| n | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |

Tabla 3. Mortalidad de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus* en 4 concentraciones de POEA y CaCO₃ durante 48 horas.

| Tiempo (h) | POEA TA15 + CaCO ₃ | | | |
|------------|-------------------------------|--|-----------------------------|---|
| | TTO1 (0) | TTO 2 (CaCO ₃ 60mg/L) | TTO 3 (POEA 2,1 mg/L) | TTO 4 (CaCO ₃ 60mg/L + POEA 2,1mg/L) |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 0 | 0 | 1 | 6 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 18 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 0 | 0 | 7 | 9 |
| n | 14 | 14 | 14 | 14 |

Figura 1. Valor de CL₅₀ del POEA a 96 horas en juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. El valor de CL₅₀ fue calculado mediante el programa Trimmed Spearman – Karber- TSK versión 1.0

| CL ₅₀ mg/L | 95% Intervalo confianza | |
|--------------------------|----------------------------|----------|
| | Inferior | Superior |
| 2,080 | 1,799 | 2,405 |

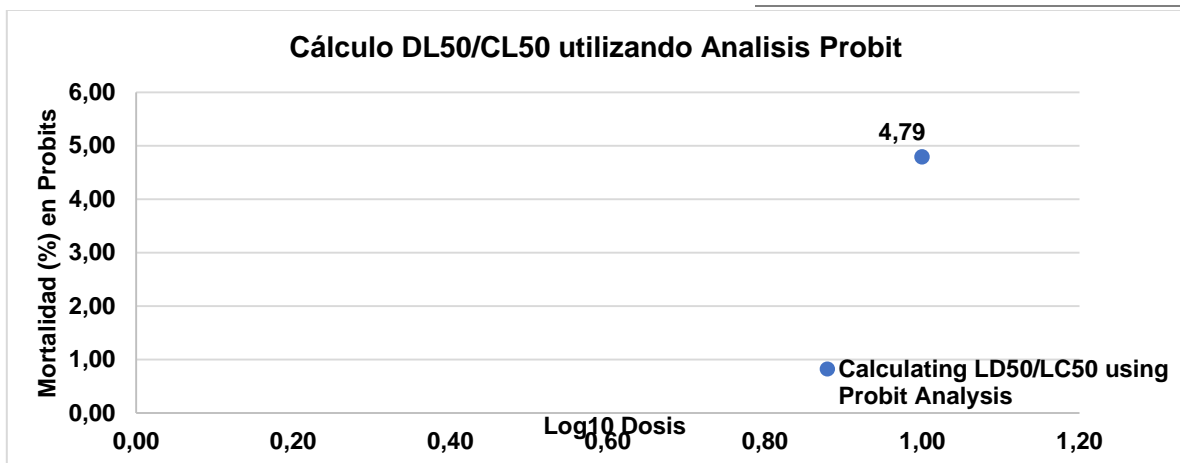


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de juveniles de cachama blanca expuestos a diferentes concentraciones de POEA TA15 durante 96 horas.

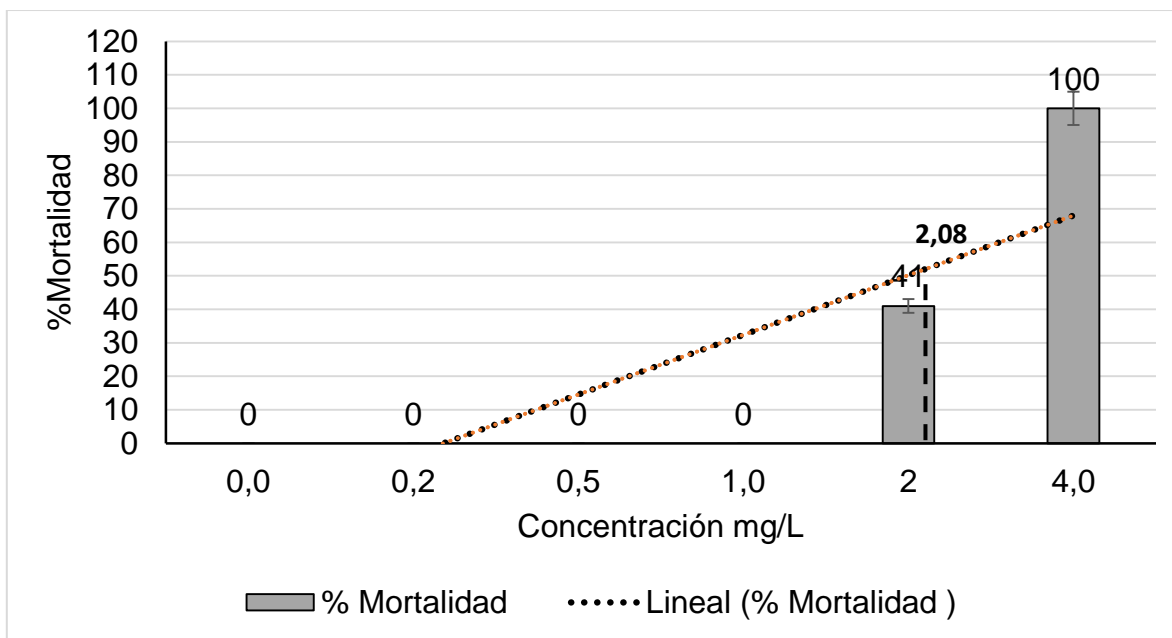


Figura 3. Piel de individuos expuestos a POEA de tratamiento control, presenta su estructura norma. Epidermis(flecha) intacta, D. dermis delgada (10x. H&E)



Figura 4. Piel de individuos expuestos a POEA de tratamiento 4, revela leve hiperplasia/hipertrofia de células de alarma epidermis. Acúmulos de pigmentos en la epidermis (flecha), necrosis de epitelio, activación de células de alarma (asterisco), edema dermis(D). (10x. H&E)

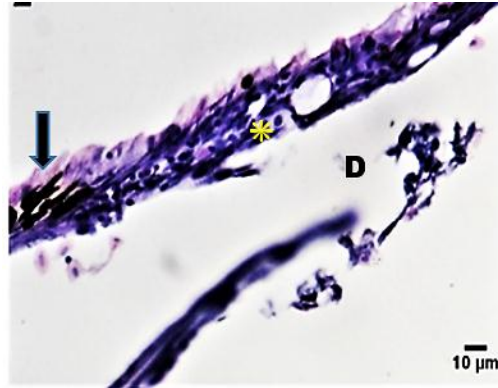


Figura 5. Branquias de individuos expuestos a POEA en tratamiento control, se puede apreciar la estructura un leve desprendimiento epitelial. Filamento (F) normal con lamelas intactas espacio interlamelar libre (flechas). (40x. H&E)

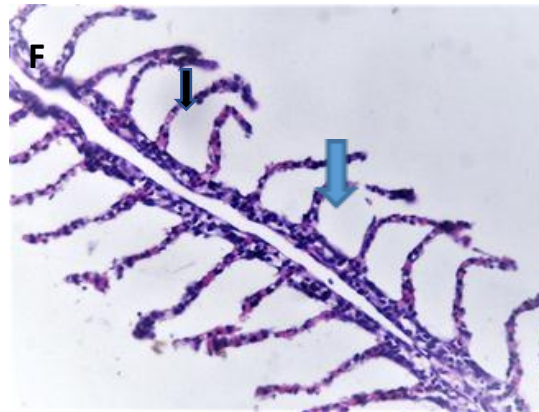


Figura 6. Branquias de individuos expuestos a POEA en tratamiento 6, revela severa fusión lamelar, hemorragias y necrosis. Filamentos Branquiales (F), adherencias interfilamentales (Flecha), fusión lamelar (punta de flechas), hiperplasias interlamelates (*) (40x. H&E)

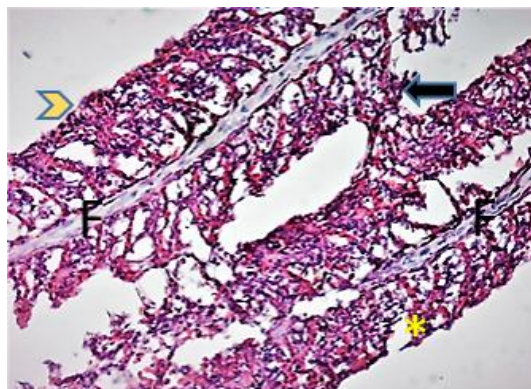


Figura 7. Hígado de individuos expuestos a POEA en tratamiento control, no revela lesiones significativas. (40x. H&E)

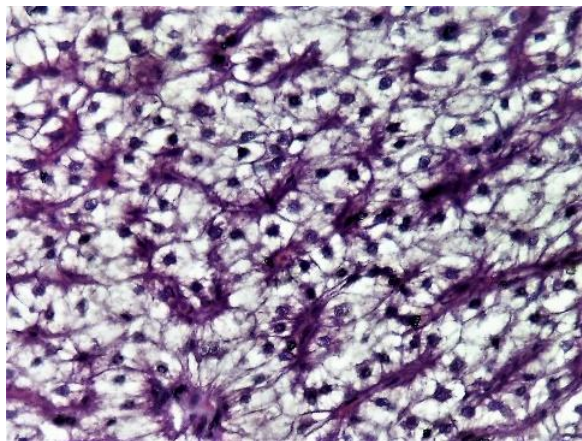


Figura 8. Hígado de individuos expuestos a POEA en tratamiento 6, presentan lesiones degenerativas multifocales. Congestión, necrosis hepatocitos (*), cambios degenerativos grasos (Flecha), necrosis de hepatocitos (N). (40x. H&E)

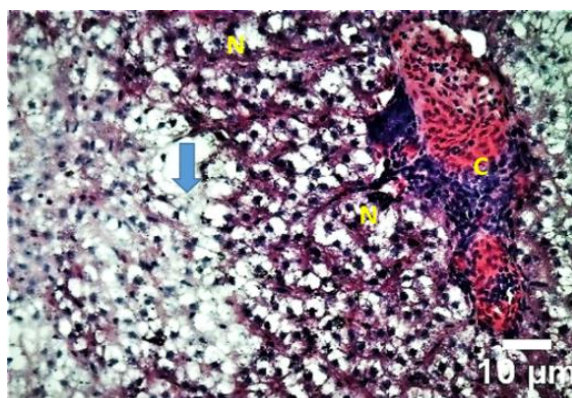


Figura 9. Cerebro de individuos del tratamiento control, no revelo anomalías. (40x. H&E)

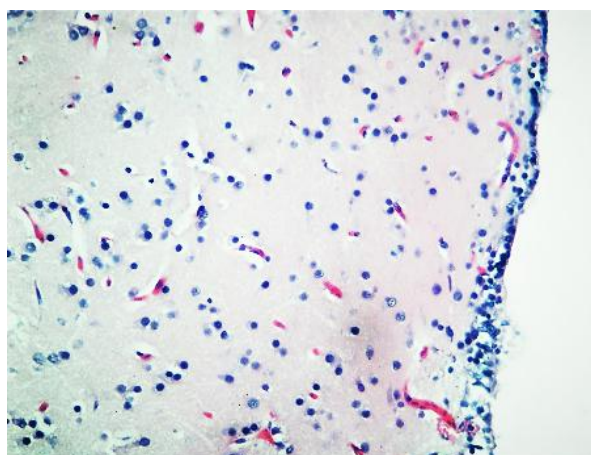


Figura 10. Cerebro de individuos del tratamiento 6, revelo hemorragia de las meninges, gliosis y necrosis. Gliosis, edema peri-neuronal (*), infiltración de CGE (flechas), necrosis neuronal (40x. H&E)

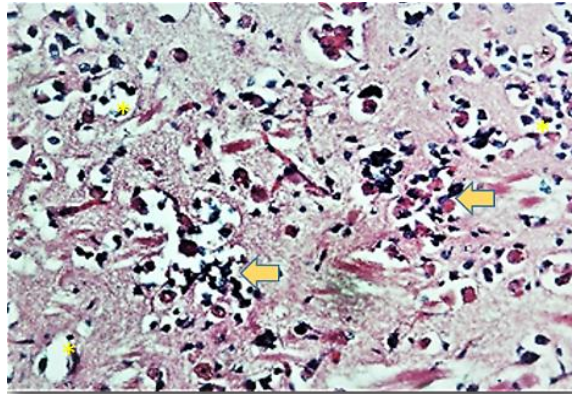


Figura 11. Sacum vasculorum de individuos en tratamiento control, no revelo daños. Epitelio.(E), vasos sanguíneos coroidales (V). (40x. H&E)

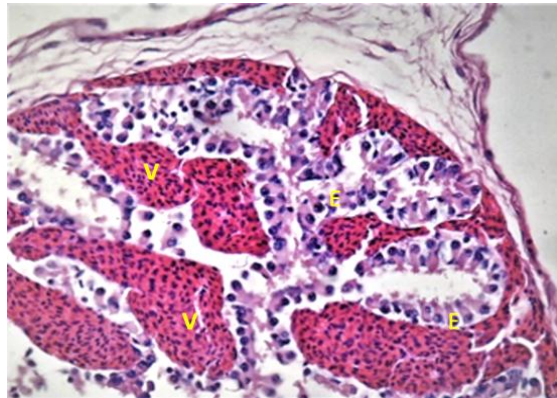


Figura 12. Sacum vasculosum de individuos expuesto en tratamiento 6, revelo espongiosis, edemas, y necrosis de cuerpos coroidales. Necrosis del epitelio coroidales(flecha) Congestión y hemorragias Sacum Vasculosum (flecha). (40x. H&E)

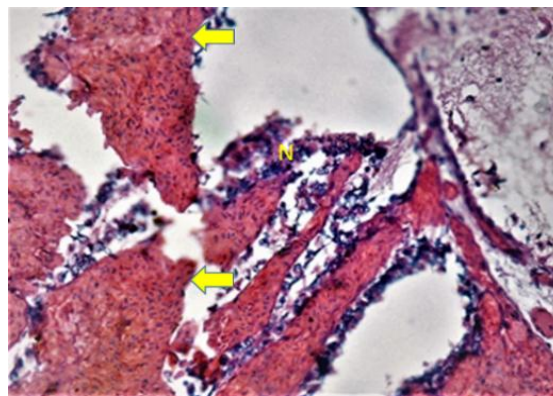


Figura 13. Riñón craneal individuos en tratamiento control, sin anormalidades. Glándulas interrenales (flechas), tejido hematopoyético (H), vasos sanguíneos (V). (10x. H&E)

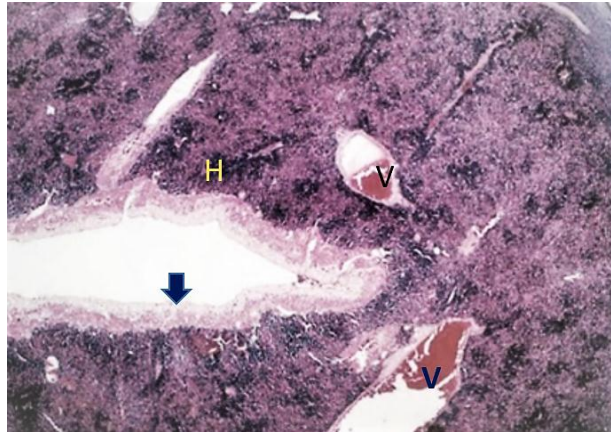


Figura 14. Riñón craneal individuos expuestos en tratamiento 5, reveló hiperplasia del tejido glandular interrenal y necrosis glandular interrenales. Necrosis tejido glandular interrenal (flechas). Congestión severa parénquima. (10x H&E).

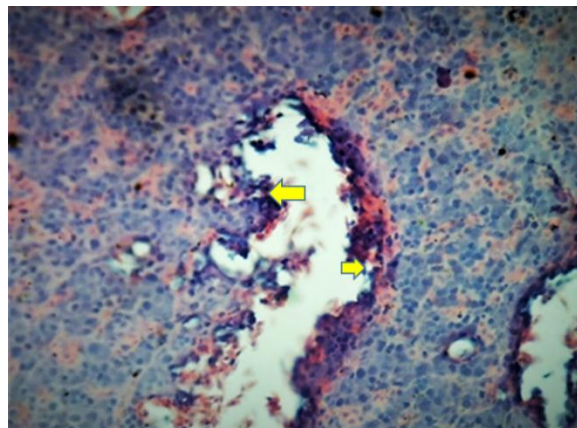


Figura 15. Riñón posterior individuos en tratamiento control, no revelo daños. Glomérulo (G),Túbulos (T) (40x. H&E)

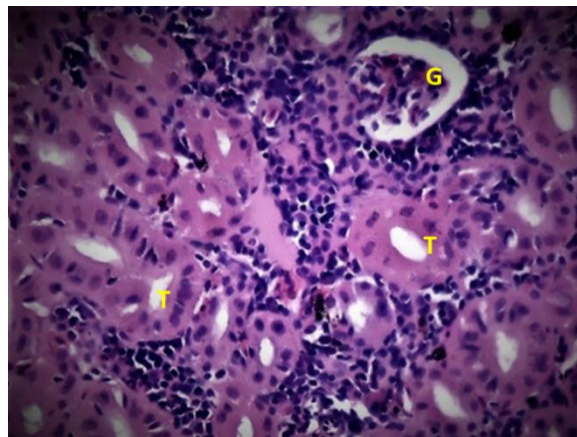


Figura 16. Riñón posterior de individuos expuestos a tratamiento 3, revelo degeneración tubular y aumento de CMM en parénquima. Riñón posterior 2 mg /L TA-15: 10x. H-E- Glomérulo (G),Túbulos (T), activación de CMM Necrosis tubular (flecha) (40x. H&E)

